

Über die nach alkalischer Behandlung
von denaturiertem Kollagen
gebildeten Spaltprodukte

NAGAMANI NAGABHUSHAN

1965



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Über die nach alkalischer Behandlung von
denaturiertem Kollagen gebildeten Spalt-
produkte.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Nagamani Nagabhushan

Mysore/Indien

1965



1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Graßmann
2. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Lynen

Tag der mündlichen Prüfung: 24.11.1965

Die vorliegende Arbeit ist eine Arbeit der
Hochschule für Angewandte Wissenschaften
Berlin, die am 1. September 1971 an der
Hochschule für Angewandte Wissenschaften
Berlin, Fachbereich Wirtschaftswissenschaften,
abgegeben wurde.

Die vorliegende Arbeit ist eine Arbeit der
Hochschule für Angewandte Wissenschaften
Berlin, die am 1. September 1971 an der
Hochschule für Angewandte Wissenschaften
Berlin, Fachbereich Wirtschaftswissenschaften,
abgegeben wurde.

Meiner Mutter

Die vorliegende Arbeit ist eine Arbeit der
Hochschule für Angewandte Wissenschaften
Berlin, die am 1. September 1971 an der
Hochschule für Angewandte Wissenschaften
Berlin, Fachbereich Wirtschaftswissenschaften,
abgegeben wurde.

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. W. Graßmann in der Zeit von Oktober 1962 bis September 1965 am Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung in München durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. W. Graßmann, meinem verehrten Lehrer, danke ich für die Themastellung sowie die großzügige Förderung der vorliegenden Arbeit.

Besonderen Dank möchte ich Herrn Priv.-Doz. Dr. K. Hannig aussprechen. Seine wertvollen Anregungen zur Planung und Durchführung dieser Arbeit sowie seine stets großzügige Unterstützung bedeutete eine große Hilfe für mich.

Inhaltsübersicht

A. EINLEITUNG	Seite
I. Allgemeines über Kollagen, dessen Unter- einheiten und die Probleme zu deren Sequenzermittlung	1
II. Aufgabenstellung	12
B. VERSUCHE UND ERGEBNISSE	
I. Ausgangsmaterial	14
1) Herstellung von Kollagen und deren Einzelketten α_1 und α_2	14
2) Gewinnung der Komponenten A und B	14
3) Nähere Charakterisierung der Kompo- nenten A und B	16
a) Rechromatographie	16
b) Prüfung auf noch eventuell vor- handene alkaliempfindliche Bindun- gen	17
c) Aminosäureanalysen	22
d) Endgruppenbestimmungen	24
II. Versuche zur weiteren Auftrennung der Komponente A bzw. B	30
1) Versuche in analytischem Maßstab	30
a) Stärkegel-Elektrophorese	30
b) Disc-Elektrophorese in Acrylamid- gel	32
2) Präparative Auftrennung der Kompen- ten A und B	35
a) Versuche zur Trennung in der träger- freien kontinuierlichen Elektro- phorese	35
b) Versuche zur weiteren präparativen Auftrennung der Komponente A bzw. B durch Gelfiltration	37
III. Nähere Charakterisierung der Fraktionen A_1, A_2, A_3 und B_1, B_2, B_3	45
1) Disc-Elektrophorese	45
2) Endgruppenbestimmung	47

	Seite
3) Aminosäureanalyse der Komponente A ₁	47
4) Molekulargewichtsbestimmungen an den Komponenten A und B sowie deren Unter- fraktionen A ₁ , A ₂ , A ₃ , B ₁ , B ₂ und B ₃	49
5) Versuche zur Renaturierung	52
C. DISKUSSION DER ERGEBNISSE	54
D. EXPERIMENTELLER TEIL	
1) Herstellung von neutralsalzlöslichem Kolla- gen	62
2) Darstellung von citratlöslichem Kollagen	62
3) Chromatographische Trennung von hitze- denaturiertem Kollagen an CM-Cellulose	63
a) Elutionslösungen	63
b) Präparation der CM-Cellulose-Säulen	63
c) Denaturierung des Tropokollagens	64
d) Elution der Säule	64
e) Registrierung der Ergebnisse	64
4) Präparative Darstellung der Komponenten A und B	65
a) Alkalibehandlung des Tropokollagens	65
b) Trennung an der CM-Cellulose-Säule	66
5) Gelfiltration	66
a) Versuche mit Bio-Gel P-60 und P-100	66
b) Gelfiltration an Sephadex G-100 und G-200	66
6) Stärkegelelektrophorese	68
7) Disc-Elektrophorese	68
8) Trägerfreie kontinuierliche Elektrophorese	70
a) Versuche zur weiteren Auftrennung von A bzw. B	71
b) Abtrennung von Kohlenhydraten aus Protein- fraktionen nach der Sephadex-Trennung	71
9) Aminosäurebestimmung	71
10) Endgruppenbestimmungen	72
a) Aminoendgruppenbestimmung nach Sanger	72
b) COOH-Endgruppenbestimmung nach Akabori	73

	Seite
11) Eiweiß-Bestimmung nach Lowry	73
12) Bestimmung von Kohlenhydraten (Anthron-Test)	74
13) Molekulargewichtsbestimmungen	74
a) Gleichgewichtsläufe nach der Yphantis- Methode	75
b) Methode der Lichtstreuung	75
 E. ZUSAMMENFASSUNG	 76
 F. LITERATUR	 78

A. EINLEITUNG

I. Allgemeines über Kollagen, dessen Untereinheiten und die Probleme zu deren Sequenzermittlung.

Die Untersuchungen, die dieser Arbeit zugrunde liegen, stellen den Versuch dar, den Schwierigkeiten und Problemen, die sich bei der Sequenzuntersuchung an dem Faserprotein Kollagen entgegenstellen, auf eine mit den heutigen Möglichkeiten der Sequenzanalytik erfolgsversprechenden Weise zu begegnen.

Bekanntlich ist die Feststellung der Primärstruktur, das heißt der Aminosäuresequenz von Proteinen, in den letzten Jahren eine der Hauptaufgaben der modernen Eiweißforschung geworden. Man hat gelernt, aus der Folge der einzelnen Aminosäurebausteine, die die Peptidkette bilden, Schlüsse für die Ausbildung der Sekundär- und Tertiärstruktur zu ziehen und man ist im Begriff, die Zusammenhänge zwischen Struktur, biochemischer und biologischer Funktion verstehen zu lernen.

Zusammen mit der Peptidsynthese wird die Sequenzuntersuchung auch in der Zukunft eine große Bedeutung behalten, denn wir wissen aus zahlreichen Beispielen wie entscheidend oft der Austausch einzelner Aminosäuren in einer Peptidkette die Wirkung eines Hormons, eines Ferments oder eines biologisch wichtigen Proteins zu verändern vermag.

Die Sequenzanalytik an Proteinen hat trotz der kurzen Zeit imponierende Erfolge aufzuweisen. Seit der durch Sanger (1) erstmals gelungenen Aufklärung der Aminosäuresequenz des aus 51 Aminosäureresten bestehenden Hormons Insulin sind Sequenzuntersuchungen auch an größeren Globularproteinen bekannt geworden. Die vorläufigen Höhepunkte dieser Entwicklung sind das vollständige Aminosäuremodell des Myoglobins (2), der Proteinkomponente des Tabakmosaik-Virus (3) sowie die Sequenz des Hämoglobins und des Cytochrom-C (4,5)

sowie der Enzyme Ribonuklease (6), Chymotrypsin (7,7a) und Trypsin (8).

Obwohl es an Bemühungen nicht gefehlt hat, sind gleichartige Untersuchungen an dem Faserprotein Kollagen nicht so rasch vorangekommen. Das hat vor allem folgende Gründe:

1. Das Molekulargewicht ist hier um ein Vielfaches größer als das der bisher zur Konstitutionsermittlung herangezogenen Proteine nämlich etwa 320.000 (9,9a). Das bedeutet - da Kollagen aus 3 Peptidketten besteht - ein Molekulargewicht von 100.000 bis 110.000 oder rund 1.200 Aminosäuren pro Einzelkette und die dreifache Anzahl für das ganze Molekül.

2. Die zweite Schwierigkeit besteht darin, daß im Falle des Kollagens die Einzelketten (die sogenannten α -Ketten) nicht so einfach voneinander zu trennen sind wie bei anderen großen, aus Untereinheiten aufgebauten Proteinen.

Bevor ich im Rahmen dieser Übersicht auf Einzelheiten über die sich bietenden Möglichkeiten zu einer erfolgversprechenden Sequenzuntersuchung am Kollagen eingehe, soll zum besseren Verständnis im folgenden zunächst das wesentliche unserer heutigen Kenntnisse über das Faserprotein Kollagen zusammengefaßt werden.

Kollagen stellt nach Vorkommen und Funktion einen sehr wichtigen Bestandteil des Bindegewebes dar und gehört unter anderem auch aus diesem Grunde zu den am besten untersuchten Proteinmakromolekülen.

Neben der von anderen Proteinen erheblich abweichenden Aminosäurezusammensetzung (siehe Tab. 1), der Fähigkeit in schwach saurem Medium stark zu quellen und der hohen Widerstandsfähigkeit des nativen Kollagens gegenüber Proteasen,

ist wohl die interessanteste Eigenschaft der Kollagenfibrille die von F.O. Schmitt (10) und fast gleichzeitig von C. Wolpers (11) entdeckte periodisch wiederkehrende Querstreifung bei elektronenmikroskopischer Betrachtung. In neueren Aufnahmen (12) kann man in Fibrillen des nativen Typs bis zu 15 innerhalb einer Periode von etwa 650 Å wiederkehrende dunkle und ebenso viel helle Querstreifen erkennen. Die kleinsten Einzelheiten, die in solchen Aufnahmen noch erkennbar sind, dürften kaum größer als 10 Å sein, also von der Größenordnung nur weniger Aminosäuren. Damit stoßen wir mit Hilfe einer optischen Methode in Bereiche vor, die den Zusammenhang zwischen sichtbarer Struktur und molekularem Aufbau vermuten lassen.

Unsere Kenntnisse über die Aminosäureanordnung im Kollagen sind noch unvollkommen, sie genügen aber zu grundsätzlichen Aussagen, aus denen heraus auch die Natur der Querstreifung verständlich ist. Wie Tab. 1 zeigt (siehe S.23), ist Kollagen gegenüber anderen Eiweißkörpern ausgezeichnet durch einen hohen Gehalt an Glycin, Prolin und Hydroxyprolin. Es ist gezeigt worden (13), daß einerseits Sequenzabschnitte existieren, die vorwiegend aus den genannten Aminosäuren aufgebaut sind und andererseits solche mit Anhäufungen polarer Aminosäuren, wobei Abschnitte mit vorwiegend basischen oder andere mit saurem Charakter anzutreffen sind.

Die polaren Abschnitte sind, wie ebenfalls gezeigt werden kann, für die Dunkelstreifen, die apolaren für die Hellbereiche des elektronenmikroskopischen Bildes verantwortlich. Diese Tatsache macht zunächst das Auftreten elektronenmikroskopisch sichtbarer Querstreifen ganz allgemein verständlich, man kann aber darüber hinaus die basischen und sauren, oder was dasselbe ist, die positiv und negativ geladenen Bereiche im elektronenmikroskopischen Bild lokalisieren und so die Brücke zwischen elektronenmikroskopischem und chemischem Ergebnis schlagen.

Das Muster der Querstreifung im einzelnen ist jedoch nur im Zusammenhang mit dem gesamten strukturellen Aufbau des Kollagens bis zur Fibrille zu verstehen.

Die Sekundärstruktur der Peptidketten des Kollagens weicht von dem üblichen Bau der α -Helix anderer Proteine ab. Die Windungen der Schraube sind, bedingt durch Starrheit der Prolinringe, steiler, wodurch eine andere Art der Faltung hervorgerufen wird.

Wie röntgenanalytische Untersuchungen zeigten (14), wird das Kollagenmolekül in seiner Tertiärstruktur aus drei von Polypeptidketten gebildeten Schraubenketten aufgebaut, die sich nach einem Strukturmodell von Rich und Crick (15) bzw. Ramachandran (16) um eine gemeinsame Hauptachse zu einer übergeordneten 3-Ketten-Schraube oder Tripelhelix verdrillen. Das ganze wird durch Wasserstoffbrücken von Peptidkette zu Peptidkette quer zur Achse verfestigt. (Vergleiche dazu Abb. 1).

Über die Länge des Moleküls sagen solche Strukturmodelle nichts aus. Es gibt aber eine lösliche Form des Kollagens, das sogenannte Tropokollagen, an dem durch physikalisch-chemische Untersuchungen wie Lichtstreuung, optische Drehung usw. nachgewiesen werden konnte, daß das Kollagenmolekül ein definiertes, sehr stabiles Stäbchen von etwa 2.800 Å Länge und 14 Å Durchmesser darstellt. Das Molekulargewicht dieses Stäbchenmoleküls beträgt etwa 330.000, ist also um mehr als eine Zehnerpotenz größer als das der wenigen bisher in ihrer Aminosäuresequenz vollkommen aufgeklärten Proteine.

Bei der chemischen oder thermischen Denaturierung zerfällt das Stäbchenmolekül in seine geknäuelten Einzelketten. (Abb. 2).

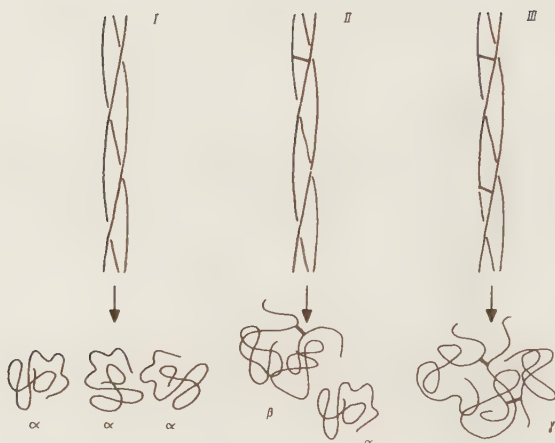


Abb. 2 Modellvorstellung der Denaturierung von Tropokollagen der Kalbshaut (nicht maßstäblich) (9a). Erklärung siehe Text.

In vielen Fällen sind zwei, in seltenen alle drei Ketten durch kovalente intramolekulare Quervernetzungen miteinander verbunden. Besteht eine Vernetzung zwischen zwei α_1 -Ketten, dann bezeichnet man das entstehende Dimere mit β_{11} -Komponente; liegt die Vernetzung zwischen einer α_1 - und einer α_2 -Kette, so liegt eine β_{12} -Komponente vor. Im γ -Kollagenmolekül sind alle drei Ketten miteinander verbunden. Kollagen ohne intramolekulare Vernetzung, bestehend aus drei α -Ketten sei mit Typ I, solches bestehend aus einer α - und einer β -Komponente als Typ II und vollständig vernetztes γ -Kollagen mit Typ III bezeichnet.

Vorhandensein und Zahl kovalenter intermolekularer Quervernetzungen ist entscheidend für den Unterschied zwischen löslichem und unlöslichem Kollagen, aber auch zwischen dem reifen jugendlichen und älteren Kollagen.

Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß die bei der Denaturierung völlig desorientierten Ketten unter besonderen Versuchsbedingungen in vitro in hoher Ausbeute und ohne zusätzliche katalysierende Einflüsse zu normalen Kollagen-Stäbchenmolekülen renaturiert werden können (20,21,22,23).

Auch der Weg vom stäbchenförmigen Kollagenmolekül bis zur sichtbaren Fibrille ist chemisch verständlich und in vitro realisierbar (vergl. Abb. 3). Aufgrund unserer Kenntnisse zur Aminosäuresequenz und aufgrund der elektronenmikroskopisch ermittelten Ladungsverteilung müssen wir nämlich entlang der Kettenmoleküle eine charakteristische Verteilung der Ladungsschwerpunkte annehmen. Wie in überzeugender Weise durch Kühn (24) in unserer Arbeitsgruppe gezeigt wurde, sind diese Ladungsschwerpunkte so verteilt, daß sich die Kollagenmoleküle bei der Fibrillenbildung so nebeneinander lagern, daß sich positive und negative Ladungen gegenüberstehen. Dies ist nur der Fall, wenn die Moleküle sich um ein Viertel ihrer Länge gegeneinander versetzt parallel zusammenlagern und die sogenannte Quarternärstruktur der Fibrille bilden, wie es in Abb. 3 schematisch angedeutet ist. Damit ist gezeigt, daß in der Aminosäuresequenz der drei Ketten, also der Primärstruktur alle Informationen gegeben sind, die zur Stäbchenmolekül des Kollagens und darüber hinaus der Bildung der Fibrille mit ihrer optisch sichtbaren Querstreifung führen.

Neben dem natürlichen, nativen Typ kollagener Fibrillen mit einer Querstreifungsperiode von $650 \text{ \AA}$ - die wie beschrieben dadurch zustande kommt, daß sich die Tropokollagenmoleküle um ein Viertel ihrer Länge gegeneinander versetzt parallel zusammenlagern - sind in den letzten Jahren noch weitere künstliche Strukturformen bekannt geworden, von denen hier lediglich die sogenannten

Long-Spacing-Segmente (SLS) erwähnt seien (24,25). Sie werden aus sauren Tropokollagenlösungen durch ATP ausgeschieden und zeigen im Elektronenmikroskop ein asymmetrisches Querstreifungsmuster mit 40-45 Querstreifen bei einer Länge von 2.800 Å. Da in den SLS die Kollagenmoleküle parallel nebeneinander gelegen sind, muss sich in ihrem Muster die Verteilung der Aminosäuren direkt widerspiegeln. (Vergl. Abb. 4). Diese Formen sind daher für die Zuordnung von Sequenzen zum elektronenmikroskopischen Bild besonders interessant geworden.

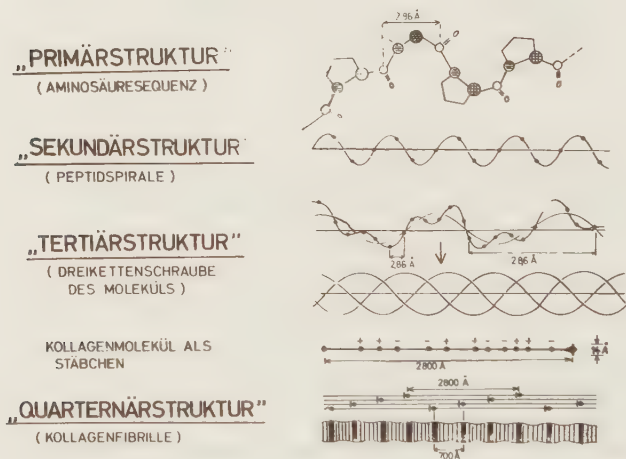


Abb. 3 Darstellung über die Ausbildung der Kollagenstruktur bis zur Fibrille.

Nach den heutigen Erkenntnissen sollte eine systematische Sequenzanalyse des Kollagens von den einheitlichen α -Ketten und, da diese mit ihren über 1.000 Aminosäureresten noch sehr groß sind, von einheitlichen Bruchstücken derselben ausgehen, die durch eine spezifische enzymatische oder chemische Spaltung an definierten Stellen der Kette erhalten werden könnten.

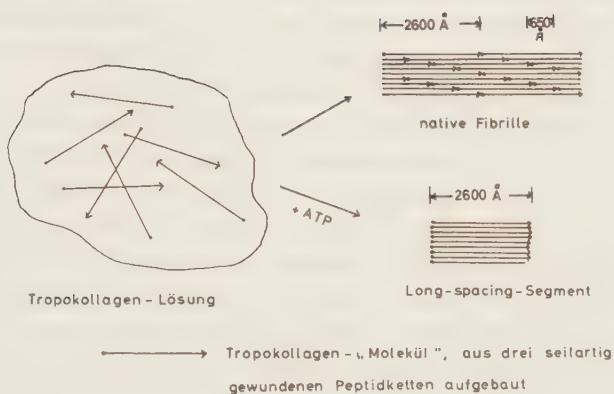


Abb. 4 Schematische Darstellung der Bildung der nativen Fibrille (a) und der Long-Spacing-Segmente (b) aus Kollagen.

Gegenwärtig kommen zu diesem Zweck etwa folgende zumindest weitgehend spezifische Methoden in Frage:

1. Die Spaltung von isolierten Einzelketten mit einer aus Kaulquappen isolierten Kollagenase (Piez, Gross (26)), wobei zwei Bruchstücke mit je ein Viertel bzw. drei Viertel der Gesamtlänge einer α -Kette erhalten werden, deren Isolierung jedoch sehr schwierig und zeitraubend ist.
2. Die Spaltung mit Hydroxylamin (Hörmann, Galopp (27,28)), wobei unter relativ gelinden Bedingungen sowohl eine Spaltung von esterartigen Quervernetzungen als auch eine Spaltung der Einzelketten in kleinere Bruchstücke erfolgt. Die Reaktion erfolgt zunächst rasch, erreicht aber keinen scharfen Endpunkt und schreitet wahrscheinlich unter unspezifischer Spaltung langsam fort. Das Auftreten unspezifischer Spaltprodukte führt somit zu verhältnismäßig komplizierten Abbaugemischen.

3. Die kürzlich beschriebene, für Methionin-Bindungen spezifische Spaltung von Proteinen mit BrCN (29,30). An denaturiertem Kollagen sind auf diese Weise Bruchstücke mit einem Molekulargewicht von etwa 15.000 - 16.000 gefunden worden (29). Dies entspricht der Bildung von etwa 18 Bruchstücken auf das Gesamtmolekül oder 6 Teilstücken je Einzelkette, was mit dem Methionin-gehalt in Übereinstimmung steht.

4. Die Behandlung von denaturiertem Kollagen mit Alkali, die wie in unserem Arbeitskreis (31) zunächst gefunden wurde, zu einem Zerfall in zwei Komponenten (bezeichnet mit A und B) führt, die durch Chromatographie an CM-Cellulose leicht im präparativen Maßstab isoliert werden können.

Welche von den genannten und eventuell weiteren Möglichkeiten oder ihre kombinierte Anwendung in der Zukunft die meiste Aussicht auf Erfolg haben wird, kann heute noch nicht mit Sicherheit vorausgesagt werden.

Eine Schwierigkeit zumindest bei den unter 1-3 angeführten Spaltungsmethoden ist die Notwendigkeit, zuerst in verhältnismäßig großen Mengen einheitliche α -Einzelketten aus denaturierten Kollagenlösungen präparativ zu isolieren und an ihnen die Spaltung vorzunehmen. Nur so sind Abbaugemische zu erwarten, die in ihrer Zusammensetzung so wenig heterogen sind, daß es möglich erscheint, die - aufgrund des periodischen Aufbaus des Kollagens - sehr ähnlichen Bruchstücke überhaupt zu isolieren. Spaltversuche am Gesamtkollagen lassen - wie auch aus früheren Ergebnissen bei Abbauprobungen mit Trypsin (32) gezeigt wurde - so komplizierte Gemische ähnlicher Produkte erwarten, daß deren vollständige Trennung mit den heutigen Möglichkeiten fast unlösbar erscheint.

Wie schon oben gesagt, bereitet aber schon die Auftrennung der Einzelketten von Kollagen erhebliche Schwierigkeiten. Als einzige bisher brauchbare Methode hat sich dazu die von Piez (17) angegebene Chromatographie denaturierter Kollagenlösungen an CM-Cellulose erwiesen. Es gelingt damit, allerdings sehr mühsam und zeitraubend und nur in verhältnismäßig kleinen Mengen und geringen Ausbeuten, die Komponenten α_1 , α_2 , β_{11} und β_{12} zu isolieren. (Vergl. dazu Versuch in Abb. 5, Abschnitt B, I). Bei der erwähnten vierten Möglichkeit, nämlich der alkalischen Spaltung, konnte aufgrund der ersten Ergebnisse von Schleyer (31) und denen in meiner Diplomarbeit (33) angenommen werden, daß dieser Weg die oben geschilderten Schwierigkeiten weitgehend ausschließt. Wie Doty und Nishihara (9) in einer kurzen Veröffentlichung ohne experimentelle Belege mitteilten, werden von denaturierten Kollagenlösungen die β -Komponenten, wenn sie kurzzeitig bei Zimmertemperatur auf pH 12 gebracht werden, in Bruchstücke gespalten, die nach Untersuchungen in der Ultrazentrifuge etwa die Sedimentationskonstante von α -Ketten ergeben. Schleyer (31) hat zeigen können, daß unter bestimmten Bedingungen der alkalischen Spaltung (pH 12; 20 Min.; 40° C) aus denaturierten Kollagenlösungen nach Trennung an CM-Cellulose zwei Spaltstücke isoliert werden können, die nach ihrem Sedimentationsverhalten ein mittleres Molekulargewicht von etwa 50.000 aufweisen und als Komponente A und B bezeichnet wurden. Das Molekulargewicht entspricht also etwa der Hälfte einer Kollageneinzelkette. Es konnte ferner gezeigt werden, daß die Komponente A aus der α_1 -Kette bzw. auch aus β_{11} , B aus der α_2 -Kette hervorgeht. Aus β_{12} wird sowohl Komponente A als auch Komponente B zu gleichen Teilen erhalten. Jede der beiden Komponenten sollte ihrerseits aus zwei Untereinheiten, nämlich A_1 und A_2 bzw. B_1 und B_2 bestehen und etwa die Hälfte einer α -Kette darstellen.

Wenn dies zutrifft, würde die Schwierigkeit zu umgehen sein, zur Gewinnung definierter Kollagenuntereinheiten zunächst α -Ketten isolieren zu müssen.

Ich konnte dieses Ergebnis im wesentlichen in meiner Diplomarbeit bestätigen. Darüber hinaus habe ich unter anderem die Optimalbedingungen der alkalischen Spaltung, sowie diejenigen zur präparativen Trennung der Komponenten A und B in größerem Maßstab festlegen können. Dagegen gelang es bisher nicht, eine präparative Trennung der zu erwartenden beiden Bruchstücke von A bzw. B zu erreichen. Lediglich die Papierhochspannungselektrophorese bei pH 3,6 ergab sowohl bei Komponente A als auch bei Komponente B eine wenn auch nicht sehr weitgehende, unscharfe Trennung in je zwei stärkere und eine schwächer erscheinende Bande. Dieses Ergebnis ließ bereits den Verdacht aufkommen, daß die alkalische Behandlung doch nicht zu scharf definierten Endprodukten führt. Auch eine durchgeführte Aminoendgruppenbestimmung erhärtete diese Vermutung. Neben aminoendständigem Glycin fanden sich auch geringere Mengen von Asparaginsäure und Glutaminsäure vor. Die eindeutige Klärung über den Reaktionsverlauf und die Anzahl der entstehenden Spaltprodukte bei der alkalischen Behandlung von denaturiertem Kollagen sollte in vorliegender Arbeit erfolgen.

II. Aufgabenstellung

Zur Fortführung der Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit ergeben sich aufgrund der im einleitenden Abschnitt beschriebenen Ergebnisse genügend Hinweise, die Arbeitsrichtung festzulegen:

Zunächst sollte versucht werden, sowohl die Komponente A als auch die Komponente B noch weiter in ihre Bruchstücke aufzuteilen. Dabei sollte eindeutig geklärt werden aus

wieviel Unterfraktionen A bzw. B zusammengesetzt ist. Ihre relative prozentuale Verteilung sollte dabei quantitativ festgestellt werden.

Ferner sollte nach Trennmethoden gesucht werden, die die Isolierung der Untereinheiten A und B in präparativem Maßstab erlauben. Wenn dies gelungen wäre, dann sollten physikalisch-chemische Untersuchungen zur genauen Festlegung der Molekulargewichte der Untereinheiten ausgeführt werden.

Durch Endgruppenbestimmungen sowohl am Carboxylende als auch am Aminoende sollte festgestellt werden, welche Peptidbindungen durch die alkalische Behandlung gelöst wurden.

In weiteren Versuchen sollte das Verhalten der isolierten Untereinheiten unter den üblichen Renaturierungsbedingungen denaturierter Tropokollagenlösung durch Verfolgung der spezifischen optischen Drehung geprüft werden. In diesem Zusammenhang war auch die Frage interessant, ob es gelingt mit den isolierten Bruchstücken von α -Ketten bei ATP-Behandlung, entsprechend ihrer Kettenlänge, verkürzte Long-Spacing-Segmente zu erhalten.

Wie nämlich Kühn (34) kürzlich zeigen konnte, lassen sich SLS auch aus isolierten α_1 und α_2 -Einzelketten mit ATP abscheiden, die das gleiche Querstreifungsmuster aufweisen wie die aus renaturierten Tropokollagenlösungen erhaltenen. Auch auf 1/4 ihrer Länge verkürzte Teilsegmente (mit der Querstreifung des ersten Viertels vom A-Ende) sind von Kühn beschrieben worden (34). Sie wurden aus nur unvollständig renaturierten Tropokollagenlösungen, anschließender Pepsinbehandlung und Ausfällung mit ATP erhalten. Über ähnliche Ergebnisse berichtete kürzlich Piez (22). Es gelang ihm, aus den oben (Seite 7) erwähnten zwei Bruchstücken, die nach enzymatischer Einwirkung von Kaulquappenkollagenase auf Kollagen erhalten worden waren,

ebenfalls verkürzte Teilsegmente entsprechender Kettenlänge ($1/4$ bzw. $3/4$) zu gewinnen.

Es hat sich im Verlauf dieser Untersuchungen jedoch gezeigt, daß die alkalische Spaltung komplizierter ist als ursprünglich angenommen wurde.

B. VERSUCHE UND ERGEBNISSE

I. Ausgangsmaterial

1) Herstellung von Kollagen und deren Einzelketten α_1 und α_2

Als Ausgangsmaterial zur präparativen Gewinnung der Komponenten A und B diente ein aus Kalbshaut nach einer etwas abgewandelten Vorschrift von Orechowitsch (35) hergestelltes citratlösliches Kollagen. (Siehe Expt. Teil). Zur Darstellung einheitlicher Einzelketten α_1 und α_2 aus denaturiertem Kollagen wurde ein aus Kalbshaut gewonnenes neutralsalzlösliches Kollagen (Tropokollagen) verwendet (siehe Expt. Teil), da bekannt ist, daß dieses Material nur verhältnismäßig wenig β -Komponenten enthält. Die qualitative Verteilung der Untereinheiten α_1 , α_2 , β_1 , β_2 und γ der auf diese Weise gewonnenen Kollagen-Präparation zeigt die Abbildung 5. Dazu wurde, wie bereits in meiner Diplomarbeit beschrieben, hitzedenaturiertes lösliches Kollagen an CM-Cellulose-Säulen chromatographiert. (Siehe Expt. Teil).

2) Gewinnung der Komponenten A und B

Die alkalische Spaltung des hitzedenaturierten Kollagens sowie die anschließende chromatographische Trennung zur präparativen Isolierung der Komponenten A und B erfolgte unter den in meiner Diplomarbeit ermittelten optimalen Versuchsbedingungen. (Vergl. Expt. Teil).

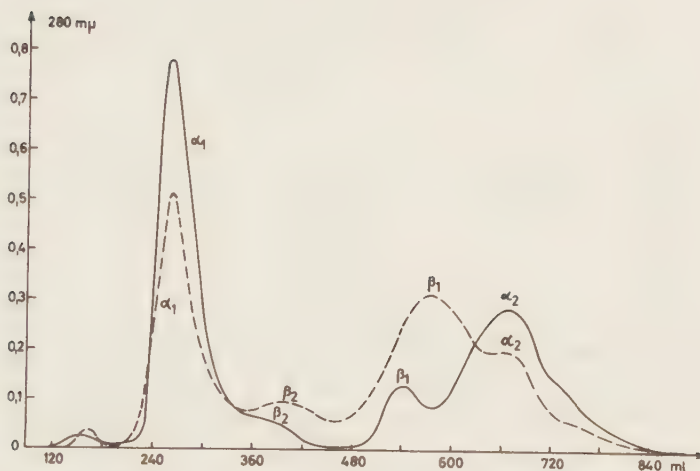


Abb. 5 Säulenchromatographische Trennung von hitze-
denaturiertem Kollagen.
NaCl-Konzentrationsgradient; 40° C; Säule: 25 cm
Länge, 2 cm Ø; Elutionsgeschwindigkeit: 80 ml/h;
Verteilungskurve: Ext. bei 230 mμ gemessen.
Kurven: ----- citratlösliches Kollagen
———— neutralsalzlösliches Kollagen

Danach erwiesen sich als günstigste Verhältnisse für die alkalische Spaltung ein pH-Wert von 12, eine Temperatur von 40° C und eine Inkubationszeit von 30 Minuten. Für die präparative Trennung wurden CM-Cellulose-Säulen von 3,5 cm Ø und 40 cm Höhe verwendet. Die Abbildung 6 zeigt eine typische Verteilungskurve der Komponente A und B. Die Kapazität der verwendeten Säulen erlaubt die Trennung von etwa 250 mg alkalisch gespaltenen Kollagens pro Versuchsansatz.

In 10 hintereinander durchgeführten Versuchen wurden 2,5 g Alkali-behandeltes Kollagen getrennt. Die gepoolten Fraktionen von Komponente A bzw. B wurden gegen destilliertes Wasser bei 4° C 24 Stunden dialysiert und anschließend gefriergetrocknet. Wie schon in der Diplomarbeit beschrieben, wurden bei der Dialyse etwa 3 % niedermolekulare Anteile (Peptide) abgetrennt, die in ihrer Aminosäurezusammensetzung

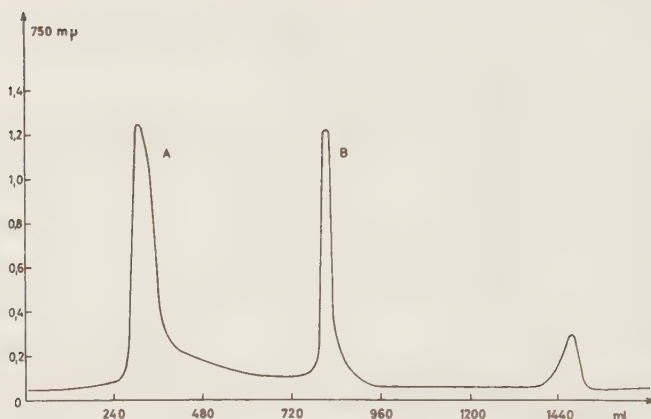


Abb. 6 Säulenchromatographische Trennung von alkalisch vorbehandeltem denaturiertem Tropokollagen an CM-Cellulose.

Elution: Natriumacetatpuffer pH 4,8; Elutionsgeschwindigkeit: 130 ml/h; Test: Nach Lowry et al (36)

verglichen mit Kollagen an Serin, Threonin und Histidin angereichert sind. Nach 10 Trennungen erhielt ich auf diese Weise 1 g gefriergetrocknete Komponente A und 0,8 g gefriergetrocknete Komponente B. Das entspricht einer Ausbeute von 85 % bezogen auf eingesetztes Ausgangsmaterial.

3) Nähere Charakterisierung der Komponenten A und B

a) Rechromatographie

Zur Kontrolle, daß bei der Chromatographie, Dialyse und Gefrier Trocknung keine Veränderungen an den Komponenten A sowie B aufgetreten sind, wurde je eine Probe von Komponente A bzw. B unter den in Abbildung 6 angegebenen Bedingungen erneut chromatographiert.

Auch die Rechromatographie an Phosphor-Cellulose und an CM-Cellulose mit Phosphatpuffern, die in anderen Fällen

bei Trennungen von Kollagenmaterial zu guten Ergebnissen führte (37), ergab sowohl für die Komponente A als auch Komponente B nur einen einzelnen Peak.

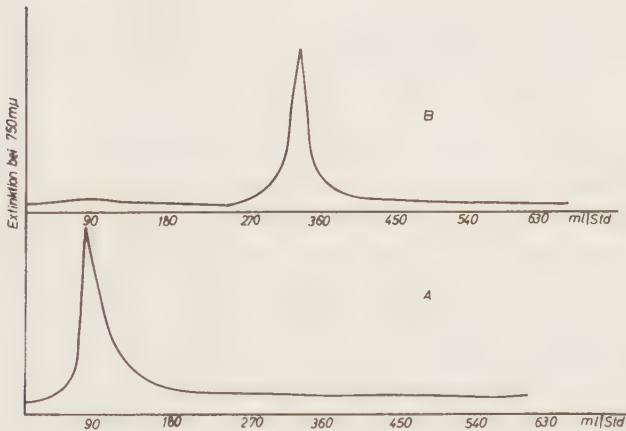


Abb. 7 Rechromatographie von Komponente A bzw. B
an CM-Cellulose-Säule
Elution: Natriumacetatpuffer pH 4,8; Elutions-
geschwindigkeit: 120 ml/h; Test: Nach Lowry et al (36)

Aus den in Abbildung 7 dargestellten Ergebnissen kann geschlossen werden, daß sowohl Komponente A als auch Komponente B keine Veränderung erfahren haben, zumindest sind keine neuen Spaltstücke festzustellen. Bei der ersten präparativen Trennung wurde bereits eine vollständige Separation von Komponente A und Komponente B erreicht.

b) Prüfung auf noch eventuell vorhandene alkaliempfindliche Bindungen.

An dem so gewonnenen A und B wurden nochmalige alkalische Spaltversuche unter den obigen Bedingungen durchgeführt, um zu klären, ob noch alkaliempfindliche Bindungen vorhanden sind.

Ich konnte dabei folgendes feststellen:

Bei einer Inkubationszeit bis zu 15 Minuten bei 40° C und pH 12 erfuhren weder Komponente A noch Komponente B erfassbare Veränderungen in Bezug auf ihr chromatographisches Verhalten an CM-Cellulose. Abbauzeiten von 30 Minuten und länger führte bei Komponente B zu einer weiteren, von der Reaktionszeit abhängigen, mehr oder weniger weitgehenden Aufspaltung (Abb. 8 b).

Dabei vermindert sich die Ausbeute von Komponente B in dem gleichen Maß wie eine neue Fraktion auftritt, die mit der Elutionsgeschwindigkeit der Komponente A die Säule verläßt und zum größten Teil dialysierbare Anteile enthält. Bei der alkalischen Behandlung von Komponente A über die angegebenen Versuchszeiten hinaus kann jedoch weder eine Veränderung des Rf-Wertes, noch das Auftreten einer neuen Fraktion dialysierbarer Bestandteile festgestellt werden, was allerdings nicht bedeutet, daß die weitere alkalische Behandlung überhaupt keine Veränderungen an dieser Komponente ergibt.

Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, daß die Spaltprodukte A und B eine einigermaßen gut zu fassende Zwischenphase des alkalischen Abbaus darstellen, daß sie aber bei längerer alkalischer Behandlung oder unter energischeren Bedingungen eine weitere Aufspaltung erfahren. (Vergl. dazu auch Diplomarbeit Nagamani (33)).

Um die Kinetik der alkalischen Spaltung zu untersuchen, habe ich zunächst versucht, durch Titration nach Waldschmidt-Leitz, die frei gewordenen neuen Carboxylendgruppen quantitativ zu erfassen. Die Empfindlichkeit der Methode war jedoch nicht ausreichend, um eine eindeutige Aussage über die Zahl der gespaltenen Bindungen zu erhalten. Dagegen zeigte die viel empfindlichere Ninhydrinreaktion, die bekanntlich auf freie α -Aminogruppen anspricht, ein klareres Bild. (Vergl. Abb. 9).

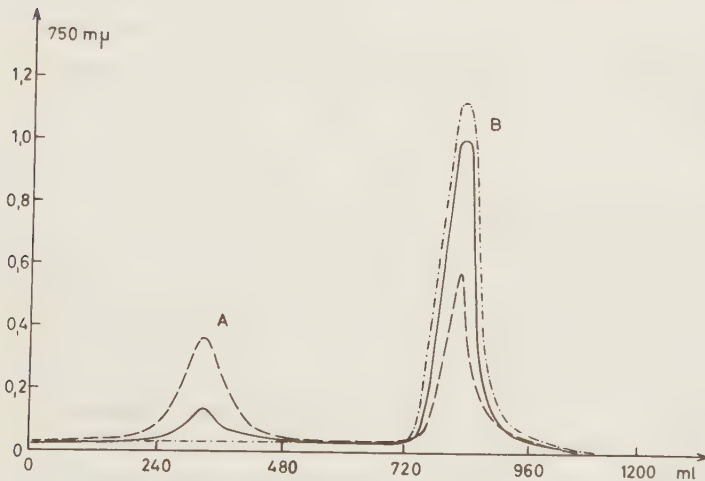
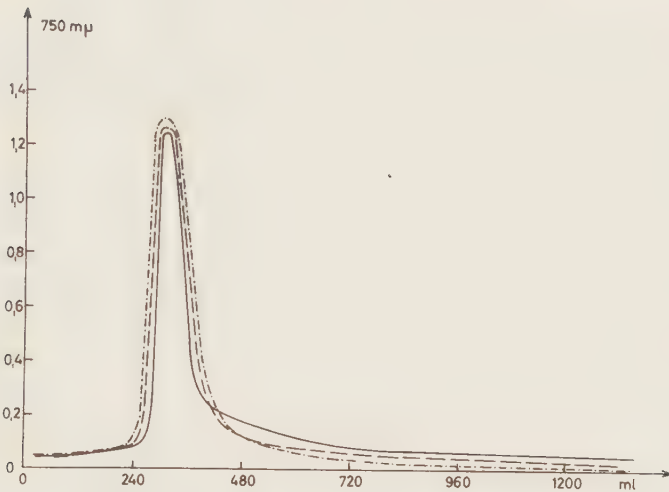


Abb. 8 a und b Säulenchromatographische Trennung der mit Alkali behandelten Komponenten A (a) und B (b) (40° C, pH 12).
Säule: 25 cm lang und 2 cm $\varnothing$; Elution: Natriumacetatpuffer pH 4,8; Elutionsgeschwindigkeit: 80 ml:h; Test: Lowry (31)
Kurven: -.-.- nicht abgebaut
———— 40 Min.
----- 120 Min.

Proben von je 0,25 ml einer 0,28 %igen Kollagenlösung, die auf pH 12 und 40° C gebracht war, wurden in abgestuften Zeitabständen entnommen und mit Ninhydrin nach der Methode von Moore und Stein (38) getestet. Die bei 578 m μ gemessenen Extinktionen wurden in Abhängigkeit zur Versuchszeit aufgetragen. (Abb. 9, Kurve A). Die Kurve zeigt deutlich eine Schulter zwischen einer Reaktionszeit von 20-50 Minuten. Merkwürdigerweise nimmt in diesem Bereich die Farbintensität der Ninhydrinfärbung geringfügig ab. Nach 50 Minuten zeigt die Kurve einen weiteren Anstieg.

Aus dem Kurvenverlauf ist zu schließen, daß die alkalische Spaltung ein komplexer Vorgang ist.

In einer schnell verlaufenden Reaktion, die etwa nach 15-20 Minuten zum Stillstand kommt, wird zunächst der Hauptanteil der Bindungen gespalten. Nach dieser Zeit muss ein Teil der freigewordenen Aminogruppen - wahrscheinlich durch Ringschluss (Diketopiperazin) - gebunden werden. Das würde den Abfall der Ninhydrinfärbung erklären.

In einer dritten, langsamer verlaufenden Reaktion läuft dann noch eine unspezifische Spaltung stetig weiter.

Um eine quantitative Aussage über die Anzahl der gespaltenen Bindungen zu erhalten, habe ich die Extinktionswerte bei 578 m μ einer Testamino-säure (Leucin) und eines Tripeptids (Leucyl-Glycyl-Glycin) nach Ninhydrinanfärbung ermittelt. Unter meinen Versuchsbedingungen ergibt sich in beiden Fällen ein Extinktionswert von 3,5 pro μ Mol Aminosäure bzw. Tripeptid.

Umgerechnet auf die eingesetzte Menge Kollagen, die den Messpunkten in der Kurve A in der Abb. 9 zugrunde liegt, ergibt sich, daß im denaturierten, nicht alkalisch behandelten Kollagen 17 freie Aminogruppen (ξ -Aminogruppen

des Lysins) vorliegen. Nach 30 Minuten alkalischer Behandlung erhöht sich dieser Wert entsprechend dem Kurvenverlauf auf 30 freie Aminogruppen, d.h. während dieser Zeit sind 13 Bindungen gespalten worden.

In meiner Diplomarbeit habe ich nachweisen können, daß es sich dabei nicht um Esterbindungen handeln kann, da die Anzahl der hydroxylaminempfindlichen Bindungen vor und nach der alkalischen Behandlung in etwa gleich geblieben sind. Bei den gespaltenen Bindungen muss es sich also um labile Peptidbindungen handeln.

Die Kurve A in Abb. 9 wurde ohne vorangegangene Dialyse der entnommenen Proben erhalten, bei der, wie ich früher feststellte (33), etwa 3 % niedermolekulare Anteile - im wesentlichen Aminosäuren - abgetrennt werden können. Um die Anzahl der gespaltenen Bindungen festzustellen, die zu großen nicht dialysierbaren Bruchstücken führt, habe ich die Messungen nach Dialyse der Proben wiederholt. (Kurve B, Abb. 9).

Entsprechend der geringen Zunahme der Intensität der Ninhydrinfärbung waren dann bedeutend weniger neue freie Aminogruppen festzustellen. Unter Berücksichtigung der Fehlergrenze der Ninhydrinreaktion kann man aussagen, daß etwa 2-3 Bindungen pro α -Kette geöffnet wurden, die zu größeren Bruchstücken führten. Dieses Ergebnis steht in guter Übereinstimmung zu Befunden, die dann auch bei der quantitativen Auswertung von Endgruppenbestimmungen erhalten wurden. (Siehe S. 24). Die darüber hinausgehende Zunahme der Aminogruppen bezieht sich auf die Bildung niedermolekularer leicht dialysierbarer Abbauprodukte und es sind auch die niedermolekularen Spaltstücke, die von der eigentümlichen mit einer Verminderung der freien Aminogruppen herrührenden Sekundärreaktion betroffen werden.

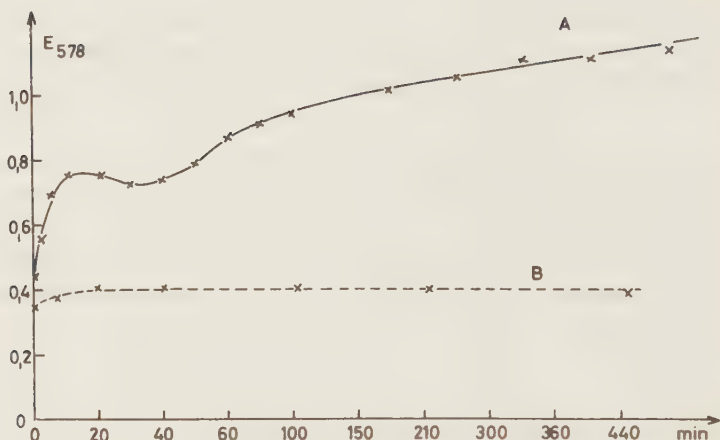


Abb. 9 Ninhydrinanfärbung von Tropokollagen während des alkalischen Abbaus in Zeitabhängigkeit.

— ohne Dialyse
 - - - nach Dialyse

c) Aminosäureanalysen

Zur weiteren Charakterisierung der Komponente A und B wurden Aminosäureanalysen und Endgruppenbestimmungen durchgeführt. Tabelle 1 zeigt die Aminosäurezusammensetzung von Komponente A und B im Vergleich zu Tropokollagen und den Untereinheiten α_1 und α_2 (31).

Wie schon von Schleyer (31) und ebenfalls in meiner Diplomarbeit (33) gezeigt wurde, entspricht die Aminosäurezusammensetzung der Komponente A weitgehend der Aminosäurezusammensetzung der α_1 -Kette und die der Komponente B derjenigen der α_2 -Kette. Die früheren (in Klammern) und jetzigen Werte zeigen befriedigende Übereinstimmung. Die

Aminosäureanalysen der Ausgangsmaterialien A und B erhärten die frühere Auffassung (Schleyer und Nagamani (31,33) daß Komponente A aus α_1 - und Komponente B aus α_2 -Ketten hervorgeht.

T a b e l l e 1

Aminosäurezusammensetzung von α_1 , α_2 , A, B sowie Tropo-
kollagen. (Mol/100 Mol AS)

Amino- säuren	TC	α_1	A	A	α_2	B	B
Asp	4,50	4,25	(4,30)	4,30	4,60	(4,50)	(4,55)
Glu	7,62	7,65	(7,60)	7,60	7,60	(7,60)	7,60
Gly	32,70	32,90	(32,80)	32,70	32,85	(32,75)	32,80
Ala	10,65	11,05	(11,05)	11,00	10,30	(10,50)	10,60
Ser	3,75	3,80	(3,70)	3,70	3,70	(3,85)	3,75
Thre	1,85	1,70	(1,80)	1,70	1,80	(1,95)	1,90
Tyr	0,35	0,30	(0,30)	0,30	0,30	(0,25)	0,30
Val	2,10	1,55	(1,55)	1,50	2,75	(2,20)	2,20
Meth	0,40	0,40	(0,40)	0,40	0,40	(0,40)	0,40
Ileu	1,25	0,80	(0,65)	0,55	1,65	(1,30)	1,30
Leu	2,40	1,95	(1,95)	1,95	2,70	(2,55)	2,55
Phe	1,40	1,30	(1,30)	1,35	1,30	(1,30)	1,30
Pro	13,15	14,00	(14,00)	14,00	12,70	(12,90)	12,85
Hyp	9,10	9,70	(9,90)	9,80	8,90	(9,70)	9,60
His	0,45	0,25	(0,25)	0,25	0,60	(0,45)	0,50
Lys	2,60	3,00	(3,00)	3,00	2,15	(2,30)	2,30
Hylys	0,60	0,50	(0,50)	0,50	0,70	(0,70)	0,70
Arg	5,10	5,00	(5,00)	5,00	5,00	(5,00)	5,00
Amid-N	(4,30)	(4,40)	(4,50)	(4,45)	(4,25)	(4,30)	(4,25)

In Klammern gesetzte Werte sind aus meiner Diplomarbeit entnommen.

d) Endgruppenbestimmungen

Qualitativ und halbquantitativ durchgeführte Endgruppenbestimmungen bestätigen in Bezug auf die Aminoendgruppen im großen und ganzen die in der Diplomarbeit erhaltenen Ergebnisse. Die Aminoendgruppenbestimmung wurde nach der Methode von Sanger (39) durchgeführt. (Vergl. Expt. Teil). Danach ermittelte ich sowohl für Komponente A als auch für Komponente B in der Hauptmenge Glycin, wenig Asparaginsäure, Glutaminsäure und Spuren von Serin, Prolin und Alanin als aminoendständige Aminosäuren (vergl. Abb 10).

Dieses Ergebnis entspricht etwa auch den Befunden, die von Bowes und Moss (40) an alkalisch behandeltem Kollagen angegeben wurden. Die genannten Autoren fanden ebenfalls in der Hauptmenge Glycin, neben wenig Glutaminsäure, Asparaginsäure und Alanin als aminoendständige Aminosäuren.



Abb. 10 Dünnschichtchromatogramme der aminoendständigen, in ihre DNP-Derivate übergeführten Aminosäuren der Komponenten A und B.

1. Dimension

Toluol:Pyridin:Äthylenchlorhydrin:Ammoniak = 100:30:60:60

2. Dimension

Benzol:Pyridin:Eisessig = 80:20:20

Nach neueren Ergebnissen von Hörmann und Mitarbeitern (41) (vergl. dazu auch Joseph und Bose (42), Bowes und Moss (40), Graßmann und Hörmann (43)), lassen sich im säurelöslichen und unlöslichen Kollagen freie α -Aminoendgruppen nur in Mengen von 0,1 Mol pro 1.000 Mol Aminosäuren feststellen. Das entspricht dem zehnten Teil der Menge, die man bei Vorliegen einer Aminoendgruppe in jeder der drei Peptidketten des Kollagens erwarten würde.

Wie Hörmann und Mitarbeiter (41) ebenfalls nachwiesen, liegen die Aminoendgruppen der Kollageneinzelketten acetyliert vor. Die Acetyl-Schutzgruppen dürften unter meinen Bedingungen der alkalischen Spaltung nicht hydrolysierbar sein. Bei der alkalischen Behandlung müssen daher nach dem Ergebnis der Aminoendgruppenbestimmung mindestens sechs Peptidbindungen pro Einzelkette angegriffen worden sein, wenn jede Endgruppe nur einmal auftritt.

T a b e l l e 2

Freie Aminoendgruppen der Komponenten A und B.

Aminosäuren	A		B	
	α -Aminoendgruppen		α -Aminoendgruppen	
	μ Mol/mg	Mol/1.000 Mol AS	μ Mol/mg	Mol/1.000 Mol AS
Gly	0,025	2,5	0,015	1,5
Asp	0,002	0,2	0,001	0,3
Glu	0,003	0,3	0,002	0,2
Pro	0,002	0,2	0,001	0,1
Ala	0,001	0,1	0,001	0,1
Ser	0,001	0,1	0,0005	0,05

Die Ergebnisse halbquantitativer Bestimmungen, erhalten durch Ausmessen der Fleckengröße der getrennten endständigen DNP-Aminosäuren am Dünnschichtchromatogramm und verglichen mit den Fleckengrößen einer bekannten Testmischung, sind

in Tabelle 2 wiedergegeben. Die Werte in der Tabelle geben für Komponente A und Komponente B jeweils in der ersten senkrechten Spalte die Menge in μ Mol gefundener endständiger Aminosäuren an, die aus 1 mg der Komponente A bzw. B erhalten worden sind. In der zweiten senkrechten Spalte sind die daraus ermittelten Mole Endaminosäuren pro 1.000 Mol Aminosäuren (entsprechend einer α -Kette) angegeben. Danach lassen sich sowohl in Komponente A als auch in Komponente B außer Glycin die übrigen endständigen Aminosäuren nur in Mengen feststellen, die für eine sehr unvollständige weitere Spaltung einer Einzelkette sprechen. Daß auch Glycin nicht mit einem ganzzahligen Mol-Verhältnis erhalten wurde, spricht ebenfalls für diesen Befund.

Dieses Ergebnis bestätigt auch die Aussagen, die sich aufgrund der Kinetik der alkalischen Spaltung ergeben (Abb. 9, Kurve B). Danach waren 2-3 spaltbare Bindungen zu erwarten, die zu größeren Bruchstücken führen. Die Endgruppenbestimmung sagt darüber hinaus aus, daß daneben noch Endgruppen gebildet sein müssen, die aus der unvollständigen Spaltung von α -Ketten hervorgehen.

In der vorliegenden Arbeit wurden darüber hinaus die Carboxylendständigen freien Aminosäuren der Komponenten A und B nach der Methode von Akabori (44) ermittelt.

Nach Hydrazinolyse wurden die Carboxylendständigen freien Aminosäuren in ihre DNP-Derivate übergeführt und mittels Dünnschichtchromatographie identifiziert. Die Abbildung 11 zeigt das Dünnschichtchromatogramm der DNP-Derivate der Carboxylendständigen Aminosäuren von Komponente A und B. In beiden Fällen lassen sich in der Hauptmenge Glutaminsäure und Glycin, neben geringen Mengen Pro, Ala und Phe als Carboxylendständige Aminosäuren feststellen. Nach Angaben der Literatur (45) lassen sich im Kollagen keine Carboxylendgruppen nachweisen. Quantitative Bestimmungen

wurden wegen der bekanntlich schlechten Ausbeuten bei der Methode von Akabori nicht durchgeführt. Schätzungen bei einer angenommenen Ausbeute von 30 % ergeben ähnliche quantitative Aussagen wie bei der Aminoendgruppenbestimmung (siehe Seite 25).

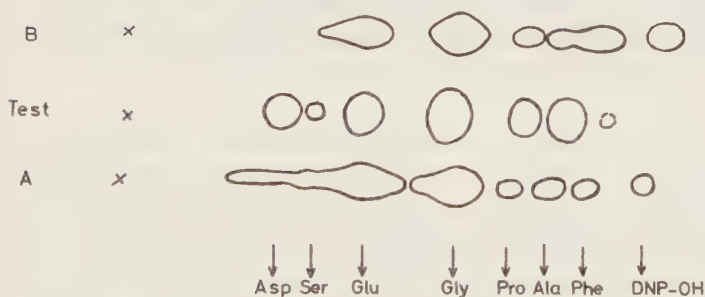


Abb. 11 Dünnschichtchromatogramm der DNP-Derivate der Carboxylendständigen Aminosäuren der Komponenten A und B.

1. Dimension

Toluol:Pyridin:Äthylenchlorhydrin:Ammoniak =
100:30:60:60

2. Dimension

Benzol:Pyridin:Eisessig = 80:20:20

Wegen der Vielzahl der aufgefundenen Endaminosäuren sowohl am Carboxyl- als auch am Aminoende ist es schwer, die alkaliempfindlichen Peptidbindungen, die gespalten wurden, mit Sicherheit anzugeben. Daß Glutaminsäure am Carboxylende neben Glycin in der Hauptmenge auftritt, spricht jedoch dafür, daß Peptidbindungen zwischen der Carboxylgruppe dieser Aminosäuren mit einer Aminogruppe einer anderen alkaliempfindlich sind. Aus der Literatur (46) ist bekannt, daß vor allem Bindungen saurer Aminosäuren mit Serin bzw. Threonin sehr wenig alkaliresistent sind. Daß nach meinen Ergebnissen jedoch aminoendständig nur sehr wenig Serin

gefunden wurde, sondern in der Hauptmenge Glycin, kann damit gedeutet werden, daß aminoendständiges Serin oder auch Threonin leicht weiter abspaltet, wenn die Spaltung durch eine geeignete folgende Sequenz energetisch begünstigt ist und als Aminoendgruppe dann die nächste Aminosäure auftritt. Diese Vermutung wird bekräftigt durch den Befund (33), daß der nach der alkalischen Spaltung erhaltene dialysierbare Anteil (im wesentlichen freie Aminosäuren) etwa 2-3 mal soviel Serin bzw. Threonin enthält wie das Ausgangsmaterial. (Vergl. dazu Tab. 3).

Wenig hydrolysebeständig sind auch Bindungen zwischen Hydroxylysin und einer anderen Aminosäure. Hierbei bildet sich das zyklische Lacton des Hydroxylysins unter Aufspaltung der Peptidbindung (47). Wenn zum Beispiel vor dem Hydroxylysin ein Serin steht, kann in der Folge Seryl-Hydroxylysin-Diketopiperazin abgespalten werden, wobei eine neue carboxylendständige Aminosäure auftritt, z.B. ein Glycin. Das Diketopiperazin wird dann unter den Bedingungen des alkalischen Abbaus weiter hydrolysiert zu der freien Aminosäure. (Siehe oben Zusammensetzung der dialysierbaren Anteile).

Ein solcher Reaktionsverlauf würde auch die oben diskutierte Verminderung der freien Aminogruppen nach der ersten Phase der alkalischen Spaltung (nach 20 Minuten) erklären und könnte eine der möglichen Sekundärreaktionen darstellen.

Es gibt noch eine Reihe weiterer Möglichkeiten, die das Auftreten so unterschiedlicher Endgruppen erklären würden, es würde aber den Rahmen dieser Arbeit übersteigen, auf alle Einzelheiten näher einzugehen.

T a b e l l e 3

Aminosäureanalyse der dialysierbaren Anteile von Tropo-
kollagen nach alkalischer Behandlung.

Aminosäuren	Aminosäure-Zusammen- setzung der dialysier- baren Bruchstücke in Mol Aminosäuren/100 Mol Aminosäuren	Aminosäure-Zusammen- setzung von Tropo- kollagen. (Zum Vergleich mit nebenstehender Spalte).
	Mol %	Mol %
Asp	4,03	4,50
Glu	4,26	7,60
Gly	24,89	32,70
Ala	8,99	10,65
Ser	<u>8,52</u>	<u>3,75</u>
Thre	<u>4,87</u>	<u>1,85</u>
Val	2,97	2,10
Ileu	2,05	1,25
Leu	2,51	2,40
Phe	1,62	1,40
Hypro	11,34	9,10
Pro	11,04	13,15
His	<u>7,15</u>	<u>0,45</u>
Lys	2,13	2,60
Arg	4,42	5,10

II. Versuche zur weiteren Auftrennung der Komponente A bzw. B.

1) Versuche in analytischem Maßstab.

a) Stärkegel-Elektrophorese

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, konnte ich im Rahmen meiner Diplomarbeit zeigen, daß eine Auftrennung der Komponente A sowie der Komponente B in der Hochspannungspapierelektrophorese möglich ist. Die Versuche waren damals jedoch in zweierlei Hinsicht unbefriedigend:

1. Die Auftrennungen waren trotz hoher Feldstärken nicht genügend scharf.
2. Adsorptionseffekte an der Cellulosefaser beeinflussten die Schärfe der Trennung.

Die Methode der Stärkegel-Elektrophorese (48,49) hat in den letzten Jahren eine große Bedeutung bei der Auftrennung von Proteinen und Proteinfractionen gewonnen. Die ausgezeichneten Erfolge, die mit dieser Technik erhalten wurden, versprachen auch im Falle der erwünschten weiteren Auftrennung der Komponenten A bzw. B gute Resultate. Um die günstigsten Bedingungen für die Durchführung der Stärkegel-Elektrophorese zu ermitteln, wurden mehrere Versuche unter Variation des Stärkegels, des Puffersystems, der pH-Werte und der Laufzeit durchgeführt. Die Stärkeblöcke waren 22 cm lang, 10 cm breit und 0,5 cm dick. Es wurden jeweils etwa 1-2 mg Substanz zur Trennung aufgetragen.

Nach der Elektrophorese wurden die Stärkeblöcke horizontal in der Mitte durchgeschnitten, so daß zwei Platten von 22 x 10 cm erhalten wurden. Die getrennten Eiweißkomponenten wurden durch Anfärbung mit Amidoschwarz 10 B sichtbar gemacht.

Die Ergebnisse wurden unter folgenden Versuchsbedingungen erhalten:

0,05 m Natriumacetatpuffer pH 4,6; Klemmenspannung 800 V (30 mA); Laufzeit 5 Stunden.

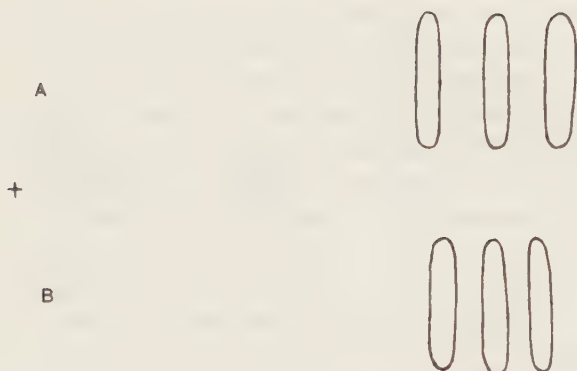


Abb. 12 Elektrophoretische Trennung der Komponenten A und B an Stärkegel.
Natriumacetatpuffer pH 4,6 (0,05 m); Spannung 800 V; 30 mA; 5 Stunden; Anfärbung mit Amidoschwarz.

Das Ergebnis der elektrophoretischen Trennung der Komponenten A bzw. B zeigt die Abbildung 12.

Ähnlich wie bei der Hochspannungspapierelektrophorese wurden sowohl bei Komponente A als auch bei Komponente B drei Hauptfraktionen erhalten, wobei die Trennschärfe gegenüber der Hochspannungspapierelektrophorese nur unwesentlich verbessert ist. Bei der Komponente A ist die Intensität von zwei Banden nahezu gleich, die dritte erscheint dagegen bedeutend schwächer. Es kann vermutet werden, daß es sich bei dieser Komponente um noch ungespaltenes Material (α -Kette) handelt. Bei der Komponente B erscheinen zwei starke und eine etwas schwächere Bande.

Nach den Endgruppenbestimmungen sollte allerdings eine größere Anzahl von Bruchstücken zu erwarten sein. Ich habe deshalb weiterhin elektrophoretische Auftrennungen mit dem in jüngerer Zeit ausgearbeiteten Verfahren der Acrylamidgel-Elektrophorese durchgeführt.

b) Disc-Elektrophorese in Acrylamidgel (50).

In Anlehnung an die von Piez und Mitarbeitern (51) durchgeführten Versuche zur elektrophoretischen Auftrennung und Charakterisierung der Untereinheiten (α_1 , α_2 , β_{11} , β_{12} und γ) von denaturiertem Kollagen in Acrylamidgel habe ich unter ähnlichen Bedingungen die Trennung der beiden Komponenten A und B durchgeführt. (Versuchsbedingungen siehe Expt. Teil).

Bei Verwendung von Alaninpuffer pH 4,6 wurden die besten Ergebnisse erhalten.

Pro Versuchsansatz wurde jeweils 0,2 mg kollagenes Material verwendet. Nach der elektrophoretischen Trennung (100 V; 6,5 mA; 3 Stunden) wurde das Gel mit Amidoschwarz 10 B angefärbt und so die Proteinfraktionen sichtbar gemacht. Abbildung 13 zeigt eine Gegenüberstellung einer auf diese Weise erhaltenen elektrophoretischen Auftrennung von bei 40° C denaturiertem neutralsalzlöslichem Tropokollagen und den unter gleichen Bedingungen durchgeführten elektrophoretischen Trennungen von isoliertem α_1 , α_2 und β_{11} , welche aus Trennversuchen an CM-Cellulose gemäß Versuch in Abb. 5 erhalten worden waren.

Danach stellt die am raschesten wandernde Komponente des denaturierten Gesamt-Kollagens die α_2 -Kette dar; geringfügig langsamer wandert α_1 , während β eine um mehr als die Hälfte geringere elektrophoretische Beweglichkeit besitzt. Die Fraktion knapp unterhalb der Auftragstelle dürfte neben einer geringen Menge γ -Komponente zum Teil renaturiertes Kollagen enthalten. Entsprechend der Verteilungskurve (Abb. 5) erscheint auch bei der Auftrennung des Ausgangsmaterials (neutralsalzlösliches Kollagen) in der Disc-Elektrophorese die α_1 -Komponente als stärkste Fraktion, α_2 entsprechend schwächer. Die in geringer Menge vorhandene Fraktion β_{11} ist nur andeutungsweise von β_{12} getrennt.

+

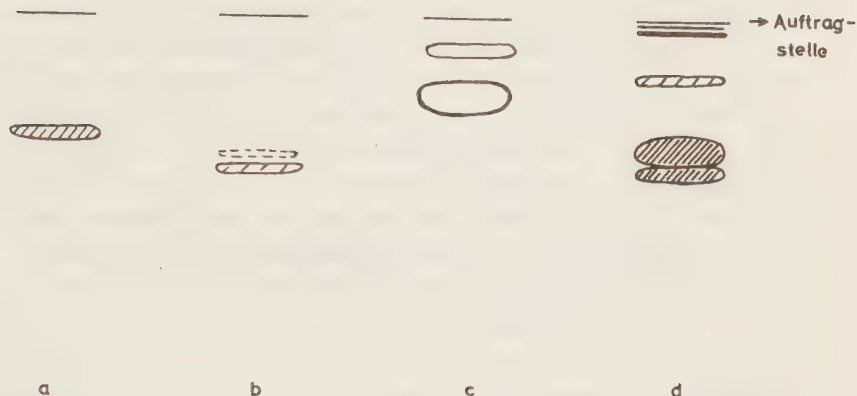


Abb. 13 Elektrophoretische Trennung der Komponenten α_1 (a), α_2 (b), β_1 (c) und Tropokollagen (d) in Acrylamidgel.
Alaninpuffer pH 4,6; 100 V; 6,5 mA; 3 Stunden;
Anfärbung mit Amidoschwarz.

Unter den gleichen Bedingungen wurden die Spaltprodukte von alkalisch behandeltem Kollagen Disc-elektrophoretisch untersucht. Abbildung 14 b zeigt, daß bei alkalisch behandeltem Material die drei Hauptkomponenten des nicht behandelten Materials (Abb. 14 a) wieder auftreten, die mit der Wanderungsgeschwindigkeit des unbehandelten übereinstimmen. Zusätzlich erscheint eine ganze Anzahl weiterer Banden. Die mit γ bezeichnete Fraktion ist dagegen nach der alkalischen Behandlung nur noch in sehr geringer Konzentration vorhanden. Bei den überraschenderweise in der Disc-Elektrophorese von alkalisch behandeltem Kollagen scheinbar erhalten gebliebenen Banden kann es sich aber aufgrund der Ergebnisse der CM-Cellulose-Trennung keinesfalls um die gleichen Fraktionen wie im Ausgangsmaterial handeln. Dieser Befund läßt sich nur damit erklären, daß sich unter den Bedingungen der Disc-Elektrophorese die elektrophoretische Beweglichkeit der Spaltstücke nicht oder nur unwesentlich von der elektrophoretischen Beweglichkeit der entsprechenden Kollagen-Einzelketten unterscheidet.

In weiteren Versuchen wurden die isolierten Komponenten A und B, jede für sich, der Disc-Elektrophorese unterworfen (Abb. 14 c und d). Im Falle der Komponente A ist die mit der Wanderungsgeschwindigkeit von B wandernde Komponente nicht mehr festzustellen. Als stärkste Bande erscheint eine dem α_1 entsprechende Fraktion. Neben einer Anzahl mengenmäßig unbedeutender Fraktionen ist eine weitere deutliche Fraktion, deren Wanderungsgeschwindigkeit um 50 % höher liegt als die der α_1 -Fraktion, nach der alkalischen Spaltung neu aufgetreten (Abb. 14 c).

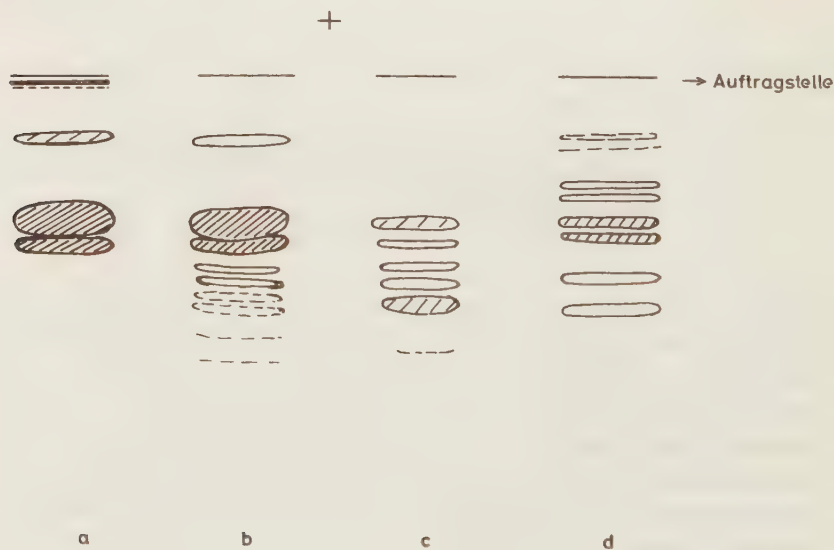


Abb. 14 Elektrophoretische Trennung der Komponente A und B sowie Tropokollagen in Acrylamidgel.
 Alaninpuffer pH 4,6; 100 V; 6,5 mA; 3 Stunden;
 Anfärbung mit Amidoschwarz.
 a = denaturiertes Tropokollagen; b = alkalisch
 behandeltes Tropokollagen; c = Komponente A:
 d = Komponente B.

Die Auftrennung der Komponente B (Abb. 14 d) läßt deutlich 7 Fraktionen erkennen, von denen die drei deutlichsten mit

der Geschwindigkeit von α_1 , α_2 und B wandern. Sowohl bei der Disc-Elektrophorese der Komponente A als auch bei der Disc-Elektrophorese der Komponente B tritt eine mit der Geschwindigkeit der α_1 -Komponente wandernde Bande auf. Dieses ist ein Beweis dafür, daß die in der Disc-Elektrophorese mit der Geschwindigkeit von α_1 wandernde Fraktion aus alkalisch gespaltenem Gesamtkollagen keine einheitliche Fraktion darstellt, denn bei der Auftrennung von alkalisch behandeltem Kollagen an CM-Cellulose-Säulen wurden je zwei eindeutig getrennte Peaks (A und B) erhalten. Wie die Disc-Elektrophorese zeigt (Abb. 13 c und d), handelt es sich bei den Komponenten A und B um recht heterogene Gemische. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit den oben angeführten Endgruppen-Bestimmungen.

Nach diesen Befunden setzten wir uns das Ziel, nach Möglichkeit wenigstens einige der Hauptbruchstücke einheitlich zu isolieren und diese näher zu charakterisieren.

2) Präparative Auftrennung der Komponenten A und B.

a) Versuche zur Trennung in der trägerfreien kontinuierlichen Elektrophorese.

Nach den Ergebnissen der Disc-Elektrophorese war zu hoffen, daß aufgrund der elektrophoretischen Beweglichkeitsunterschiede auch eine elektrophoretische Trennung in der trägerfreien kontinuierlichen Elektrophorese möglich sein würde. Bereits in meiner Diplomarbeit wurde ein entsprechender orientierender Versuch durchgeführt. (1 n Essigsäure; pH 2,3; 2.200 V; 120 mA).

Da unter den damals gewählten Bedingungen jedoch keine Auftrennung von Komponente A bzw. B in Unterfraktionen erreicht wurde, setzt ich nunmehr die Versuche unter variierten Bedingungen fort. Trotz der in weiten Grenzen geänderten Versuchsbedingungen in weiteren Trennversuchen

gelang es mir nicht, eine elektrophoretische Auftrennung der Komponente A bzw. der Komponente B in mehrere den Disc-elektrophoretischen Befunden entsprechende Fraktionen zu erreichen.

Als Beispiel sei lediglich ein unter folgenden Bedingungen ausgeführter Parallel-Versuch zur weiteren Auftrennung von Komponente A bzw. B erwähnt.

Elektrodenpuffer: 0,08 m Natriumacetatpuffer pH 4,4
 Kammerpuffer: 0,02 m Natriumacetatpuffer pH 4,4
 2.150 V; 160 mA; +9°C; Getrennte Substanzmenge: jeweils 20 mg von Komponente A bzw. B (Abb. 14).

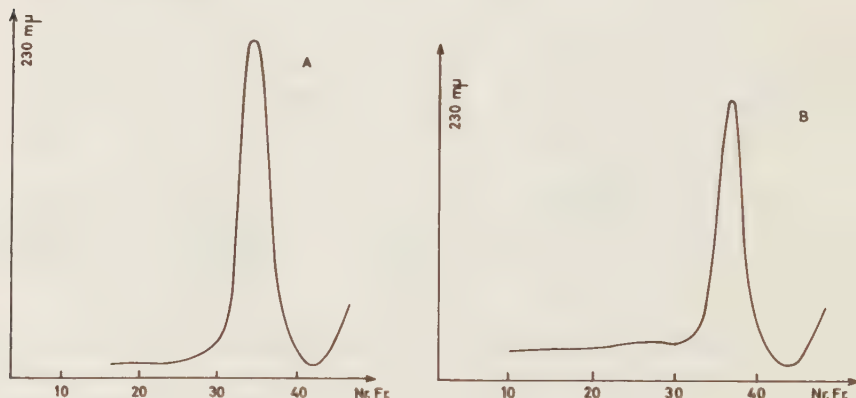


Abb. 15 a und b Trennversuche der Komponente A bzw. B in der trägerfreien kontinuierlichen Elektrophorese.
 Natriumacetatpuffer pH 4,4; (Elektrodenpuffer: 0,08 m; Kammerpuffer: 0,02 m)
 2.150 V; 160 mA; Test: Nach Lowry et al (36)
 Kurven: ----- Komponente A (a)
 ————— Komponente B (b)

Die in Abb. 15 dargestellten Ergebnisse der trägerfreien kontinuierlichen Elektrophorese zeigen zunächst, daß sich die Komponenten A und B in ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit kaum unterscheiden. Weiterhin beweisen sie, daß unter den angegebenen Versuchsbedingungen eine Auftrennung von A bzw. B in Unterfraktionen nicht zu erreichen ist.

Da bei pH-Werten oberhalb pH 5 Ausflockung erfolgt, konnten keine Versuche oberhalb pH 5 durchgeführt werden. Die in der Disc-Elektrophorese mögliche Auftrennung muß deshalb auf einen Sieb-Effekt des Gels zurückzuführen sein. Die einzelnen Bruchstücke dürften sich kaum in ihrer Ladung, sehr wohl dagegen in ihrem Molekulargewicht unterscheiden. Aus diesem Grunde konnte eine erfolgreiche Trennung durch Gelfiltration erwartet werden.

b) Versuche zur weiteren präparativen Auftrennung der Komponente A bzw. B durch Gelfiltration.

Die Methode der Gelfiltration stellt ein chromatographisches Verfahren dar, das die Trennung von Molekülen aufgrund unterschiedlicher Molekülgrößen erlaubt. Die sogenannten Molekülsiebe haben sowohl in der analytischen als auch in der präparativen Chemie zunehmende Bedeutung erlangt (Porath (52)).

In der Eiweißchemie werden vornehmlich zwei Arten geeigneter Gele verwendet:

Das unter der Bezeichnung Bio-Gel P eingeführte Material (Bloemendal (53)) ist ein Copolymer von Acrylamid und Methylenbisacrylamid. Durch Variation des Verhältnisses des Monomeren und des vernetzenden Agens entstehen Gele verschiedener Porengröße. Dieses und das für Disc-Elektrophorese verwendete Trägermaterial ist nahezu identisch. Der Unterschied besteht darin, daß das für die Disc-Elektrophorese verwendete Material in den Elektrophorese-Röhrchen selbst polymerisiert wird, während das zur Gelfiltration verwendete Bio-Gel P-60 und Bio-Gel P-100 schon in polymersisiertem Zustand als kugelförmiges Teilchen (50-150 mesh) geliefert wird und in im Wasser gequollenem Zustand in die Säule eingeschlämmt wird.

Das zweite dieser Gele ist unter dem Namen Sephadex im Handel. Es wird durch Quervernetzung der linearen Makro-

moleküle von Dextran hergestellt und besteht folglich aus einem dreidimensionalen Netzwerk von Polysaccariden (Porath (53)).

Sephadex verhält sich indifferent gegenüber Kationen und Anionen. Es enthält viele Hydroxyl-Gruppen und ist daher stark hydrophil. Die Größe und Zahl der Poren hängt vom Vernetzungsgrad ab.

Moleküle, die größer als die Poren der gequollenen Gel-Körner sind, können in diese nicht eindringen, sie wandern an ihnen vorbei und verlassen die Säule praktisch mit der Elutionsfront. Je kleiner die Moleküle des Gemisches sind, umso mehr Poren sind für sie im Gel zugänglich. Sie erscheinen daher im Eluat in der Reihenfolge abnehmender Molekülgröße.

Trennversuche an Bio-Gel P-60 und Bio-Gel p-100.

Die guten Trennerfolge in der Disc-Elektrophorese an Acrylamidgel veranlassten mich, für die präparative Auftrennung der Komponenten A und B zunächst Bio-Gel P-60 und Bio-Gel P-100 zu verwenden. Zu diesem Zweck wurden Säulen von 1 m Länge und 1 cm Durchmesser gebraucht.

Je 20 mg der Komponente A bzw. B wurden in 0,1 n Essigsäure gelöst und auf die Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte mit 0,1 n Essigsäure in einer Geschwindigkeit von 6 ml/h. Die Fraktionen wurden mittels eines Fraktions-sammlers aufgefangen, und die Eiweißverteilung durch Messung der Extinktion bei 230 m μ ermittelt. Die folgende Abbildung zeigt das Ergebnis.

Obwohl die verwendeten Bio-Gele P-60 und P-100 für Proteinfractionierungen in der Größenordnung der zu erwartenden Bruchstücke geeignet sind, deutete sich weder bei der Komponente A noch bei der Komponente B eine Auftrennung an. Beide erschienen in diesen Versuchen, wie Abbildung 16 zeigt,

ungetreten mit der Elutionsfront.

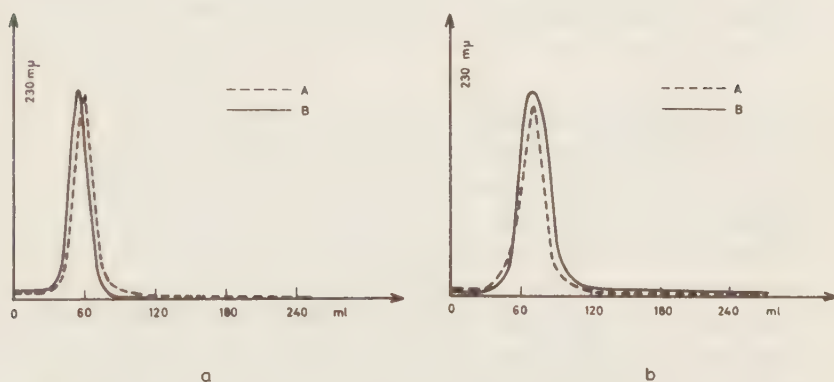


Abb. 16 Trennversuche der Komponente A und Komponente B an Bio-Gel P-60 bzw. P-100.
 Elution: 0,1 n Essigsäure; 6ml/h; Extinktion bei 230 mμ.
 a = Bio-Gel P-60; b = Bio-Gel P-100
 ----- Komponente A
 ————— Komponente B

Dieses negative Ergebnis steht scheinbar im Widerspruch zu den guten Trennergebnissen der Disc-Elektrophorese. Bei der Disc-Elektrophorese handelt es sich aber um ein homogenes Gel, durch dessen mehr oder weniger große Poren die Substanz-Moleküle durch die Kraft des elektrischen Feldes bewegt werden. Kleinen Molekülen wird von Seiten des homogenen Gels ein geringerer Widerstand entgegengesetzt als großen Molekülen. Bei gleicher Ladung werden also erstere rascher wandern. Wie oben ausgeführt, liegen die Verhältnisse bei der Gel-Chromatographie gerade umgekehrt. Hier wandern die größten Moleküle einer Mischung am raschesten, da sie in die Poren der Gel-Partikel nicht eindringen können, sondern mit der Elutionsflüssigkeit an ihnen vorbei strömen. Die Porengröße des verwendeten Bio-Gels P-60 und P-100 scheint nicht ausreichend zu sein, um ein Eindringen von Molekülen in der Größenordnung der Fraktionen der Komponenten A und B zu ermöglichen und damit

ihre Elution zum Zwecke der Auftrennung zu verzögern. Die Porengröße in Gelen, die bei der Disc-Elektrophorese benutzt werden, sind nicht genau bekannt, sicher sind sie aber größer, da diese Gele meist weniger vernetzt sind.

Trennversuche an Sephadex G-100 und G-200

Wie ich in Vorversuchen feststellen konnte, eignet sich für die weitere Auftrennung der Komponente A am besten Sephadex G-100, für die Auftrennung der Komponente B Sephadex G-200. Es wurden Säulen von 1 m Länge und 2,54 cm Durchmesser verwendet, die Elution der Säulen mit 0,1 n Essigsäure erfolgte von unten nach oben. Je 30 mg der Komponente A bzw. Komponente B wurden aufgetragen und die Säulen mit einer Geschwindigkeit von 6 ml/h eluiert. Fraktionen zu je 3 ml wurden aufgefangen und darin die Eiweißkonzentration durch Extinktions-Messung bei 230 mμ ermittelt. Unter diesen Bedingungen konnte sowohl bei Komponente A als auch bei Komponente B eine Differenzierung erzielt werden. Die Abbildung 17 a und b zeigt die Verteilungskurven.

Die Trennschärfe ist allerdings wenig befriedigend im Vergleich zu den Ergebnissen der Disc-Elektrophorese, sie ließ sich jedoch auch durch Variation der Bedingungen nicht verbessern.

Die Verteilungskurven (Abb. 17) zeigen je 3 Fraktionen, die ich mit A_1 , A_2 , A_3 und B_1 , B_2 , B_3 bezeichnete. Zur präparativen Gewinnung dieser Fraktionen wurde jeweils nur der in der Abbildung schraffiert gezeichnete Anteil gesammelt. Die so erhaltenen Fraktionen wurden gefriergetrocknet und unter gleichen Bedingungen rechromatographiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 18 und in Abbildung 19 dargestellt.

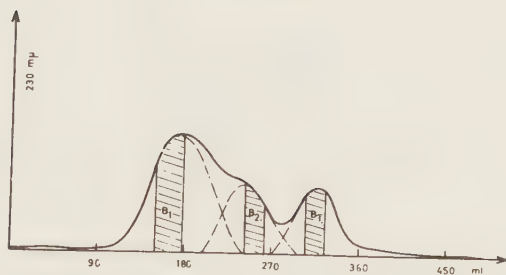
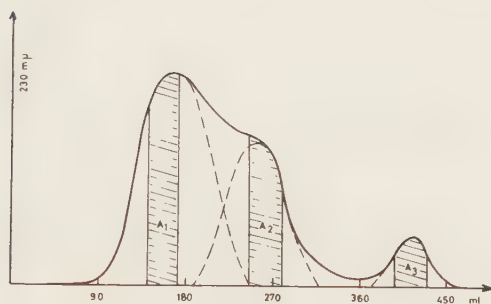


Abb. 17 Trennversuche der Komponenten A und B an
Sephadex G-100 bzw. G-200.
 Elution: 0,1 n Essigsäure; 6-8 ml/h;
 Extinktion bei 230 mμ.

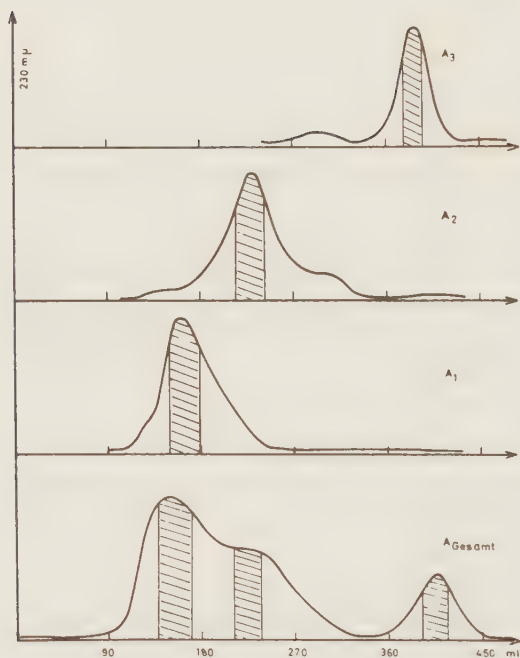


Abb. 18 Rechromatographie der Fraktionen A_1 , A_2 , A_3 an Sephadex G-100.
Aufsteigend eluiert mit 0,1 n Essigsäure;
10 ml/h; Extinktionsmessung bei 230 mμ.

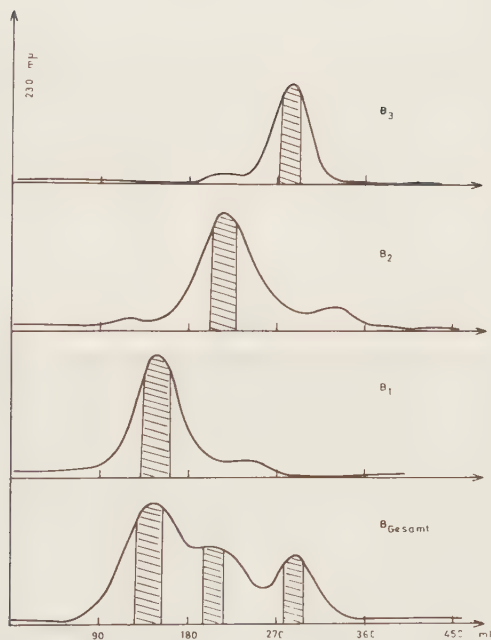


Abb. 19 Rechromatographie der Fraktionen B_1 , B_2 , B_3
an Sephadex G-200.
 Aufsteigend eluiert mit 0,1 n Essigsäure;
 8 ml/h; Extinktionsmessung bei 230 mp.

Die rechromatographierten Fraktionen wurden wieder entsprechend den schraffiert gezeichneten Abschnitten gesammelt und gefriergetrocknet. In 30 Versuchen wurden aus 1 g Komponente A nach der Trennung und Rechromatographie folgende Mengen an Unterfraktionen erhalten:

A₁ : 70 mg A₂ : 60 mg A₃ : 35 mg.

Die rechromatographierten Fraktionen der Komponente B wurden wieder entsprechend den schraffiert gezeichneten Abschnitten gesammelt und gefriergetrocknet. In 25 Versuchen wurden aus 0,8 g der Komponente B nach der Trennung und Rechromatographie folgende Mengen an Unterfraktionen erhalten:

B₁ : 60 mg B₂ : 60 mg B₃ : 40 mg

Bei der säulenchromatographischen Trennung der Komponente B an Sephadex-G-200 unter Verwendung von 0,1 n Essigsäure als Elutionsmittel erschienen in sämtlichen Fraktionen Abbauprodukte (Kohlenhydrate) des Dextrans, welche bei den weiteren Versuchen störend wirkten. Deswegen wurde aus den entsprechend der Proteinverteilung gesammelten Fraktionen das Kohlenhydrat mit Hilfe der trägerfreien kontinuierlichen Elektrophorese abgetrennt (siehe Expt. Teil). Die Experimente wurden unter Verwendung von 1 n Essigsäure als Kammer- und als Elektrodenpuffer durchgeführt. Das Protein-Kohlenhydrat-Gemisch wurde mit einer Geschwindigkeit von 0,8 ml/h eingespritzt. In den 50 Fraktionen wurde sowohl die Zucker- als auch die Proteinkonzentration festgestellt. Für die Zuckerbestimmung verwendete ich den Anthrontest (54), für die Proteinbestimmung den Lowry-Test (36).

Die folgende Abbildung gibt einen Überblick über die Verteilung von Kohlenhydrat sowie Protein. Es gelang somit, die Eiweißfraktionen völlig von störendem Kohlenhydrat zu reinigen (Abb. 20).

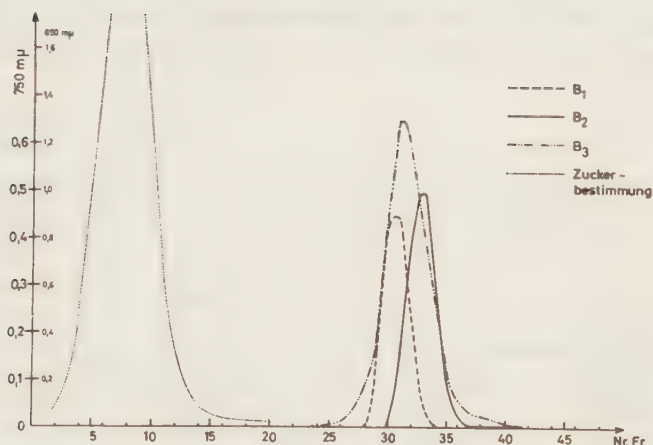


Abb. 20 Abtrennung von Kohlenhydraten aus Fraktionen der Sephadex Gelfiltration mittels der trägerfreien kontinuierlichen Elektrophorese.
Puffer: 1 n Essigsäure; 2.150 V; 130 mA; Protein-Test: Nach Lowry; Zucker: Anthron Test.

III. Nähere Charakterisierung der Fraktionen A₁, A₂, A₃ und B₁, B₂, B₃.

1) Disc-Elektrophorese

Zur Homogenitätsprüfung von A₁, A₂, A₃ bzw. B₁, B₂, B₃ (Abb. 21) wurden diese Unterfraktionen in der Disc-Elektrophorese untersucht. Danach erwies sich lediglich Komponente A₁ als einheitliche Bande, während A₂ und A₃ neben einer Hauptfraktion noch mehrere schwächere NebenkompONENTEN zeigten.

In der Abbildung 21 ist das Disc-Elektropherogramm der Gesamtkomponente A aus dem oben angeführten Versuch (Abb. 13 c) zum Vergleich mitangeführt. A₁ entspricht demnach der am langsamsten wandernden, verhältnismäßig scharfen Bande der Komponente A. Aufgrund der oben angeführten Überlegungen

muß es sich dabei um die Fraktion mit dem höchsten Molekulargewicht der Mischung handeln. Die Wanderungsgeschwindigkeit in der Disc-Elektrophorese ist, wie ebenfalls festgestellt wurde, ähnlich der der α -Komponente

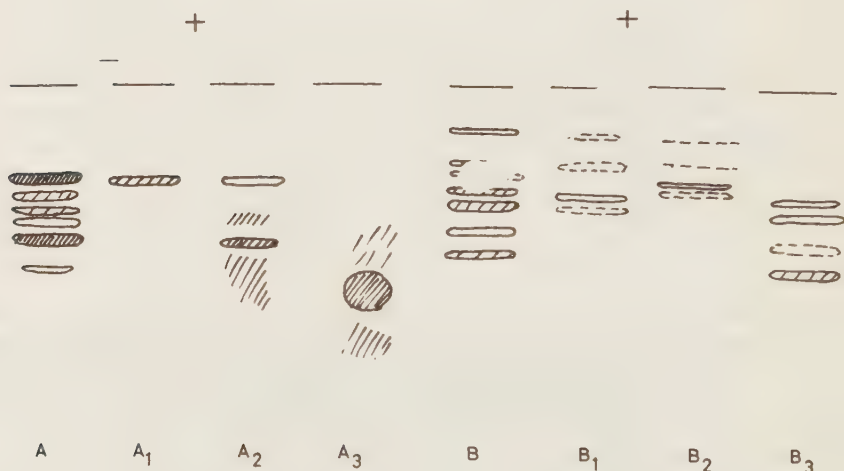


Abb. 21 Trennversuche der Unterfraktionen A₁, A₂, A₃ und B₁, B₂, B₃ in Acrylamidgel.
Alaninpuffer pH 4,6; 100 V; 6,5 mA; Anfärbung mit Amidoschwarz 10 B.

Die Auftrennung der Unterfraktionen B₁, B₂ und B₃, deren Disc-Elektropherogramme ebenfalls der Auftrennung der Komponente B aus dem oben angeführten Versuch in der Abb. 21 gegenübergestellt sind, ergab, daß keine der Unterfraktionen B₁, B₂, B₃ eine einheitliche Substanz darstellt. Grundsätzlich kann aus diesem Trennversuch entnommen werden, daß B₁ die langsamen, B₂ die mittleren und B₃ die am schnellsten wandernden Fraktionen der Gesamtkomponente B

darstellen. Dieses Ergebnis beweist nunmehr klar, daß es nicht gelingt, denaturiertes Kollagen durch alkalische Behandlung einfach in 2 halbe α -Ketten zu zerlegen, wie früher angenommen worden war.

2) Endgruppenbestimmung

Die Ergebnisse der qualitativ durchgeführten Bestimmungen der aminoendständigen Aminosäuren sind in Tabelle 4 zusammengefaßt.

T a b e l l e 4

Fraktion	Gly	Glu	Asp	Pro	Ala	Ser
A ₁	+++	-	-	-	(+)	-
A ₂	++	(+)	(+)	+	+	(+)
A ₃	++	(+)	(+)	(+)	(+)	+
B ₁	+++	+	+	(+)	(+)	-
B ₂	++	(+)	(+)	+	+	-
B ₃	++	+	-	(+)	(+)	+

Dieses Ergebnis zeigt ebenfalls, daß von den Unterfraktionen der Komponenten A und B lediglich die Fraktion A₁ im wesentlichen nur eine aminoendständige Aminosäure, nämlich Glycin, aufweist. Daneben läßt sich eine Spur endständiges Alanin nachweisen, das aus einer kleinen Menge einer beigemengten Nebenkompente herrühren dürfte.

3) Aminosäureanalyse der Komponente A₁

Tabelle 5 enthält eine Gegenüberstellung der Aminosäurezusammensetzung von A₁, α_1 und Tropokollagen. Auf Aminosäureanalysen der anderen Unterfraktionen (A₂, A₃, B₁, B₂, B₃) wurde bewußt verzichtet, da es sich in diesen Fällen um heterogene Gemische handelt.

T a b e l l e 5

Aminosäureanalysen von α_1 , A₁ und Tropokollagen (Mol/100 Mol AS)

Aminosäuren	Tc	α_1	A ₁
Asp	4,50	4,25	4,26
Glu	7,60	<u>7,65</u>	<u>8,46</u>
Gly	32,80	<u>32,80</u>	<u>30,51</u>
Ala	10,65	<u>11,05</u>	<u>10,43</u>
Ser	3,75	3,80	4,18
Thr	1,75	1,70	1,22
Tyr	0,35	0,30	0,31
Val	2,10	1,55	1,87
Met	0,45	0,40	0,53
Ileu	1,25	0,80	0,60
Leu	2,40	1,95	1,96
Phe	1,40	1,30	1,28
Pro	13,15	14,00	13,40
Hypro	9,10	<u>9,70</u>	<u>11,70</u>
His	0,45	0,25	0,31
Lys	2,60	3,00	2,75
Hyls	0,60	0,50	0,57
Arg	5,10	5,00	5,20
Amid-N	(4,30)	(4,40)	(4,40)

Wie die Gegenüberstellung der Analysenwerte von α_1 und A₁ zeigt, ergeben sich vor allem bei den Aminosäuren Glycin, Alanin, Glutaminsäure und Hydroxyprolin auffallende Unterschiede. Es erscheint nach diesen und anderen Ergebnissen sicher, daß durch die alkalische Behandlung von Tropokollagen aus der α_1 -Kette neben in geringerer Menge auftretenden Bruchstücken, in der Hauptsache eine Komponente mit der Bezeichnung A₁ hervorgegangen ist, die sich in der Aminosäurezusammensetzung von der α_1 -Kette geringfügig unterscheidet.

4) Molekulargewichtsbestimmungen an den Komponenten A und B sowie deren Unterfraktionen A_1 , A_2 , A_3 , B_1 , B_2 und B_3 .

Das Sedimentationsverhalten der Komponente A und B in einer analytischen Ultrazentrifuge ist bereits in meiner Diplomarbeit beschrieben. Aus den damaligen Befunden errechneten sich nach der Methode von Williams et al (55) für die Komponente A ein mittleres Molekulargewicht von 50.000, für die Komponente B ein solches von 50.000 bis 60.000. Wir nahmen, wie erwähnt, aufgrund dieses Befundes an, daß die $\mathcal{L}$ -Ketten mit einem Molekulargewicht von rund 100.000 durch die alkalische Spaltung in zwei etwa gleich große Bruchstücke gespalten worden sind. Aufgrund der oben angeführten Ergebnisse in der Disc-Elektrophorese und der Endgruppenbestimmungen muss jedoch diese Auffassung revidiert werden. Wegen der Heterogenität der Komponenten A und B, die sich auch schon in früheren Sedimentationsversuchen in der Ultrazentrifuge durch das Auftreten verhältnismäßig breiter Gipfel in den Sedimentationskurven andeutete, müssen Zweifel an der Richtigkeit der damaligen Molekulargewichtsbestimmungen aufkommen. Die Molekulargewichtsbestimmungen mußten daher mit anderen Methoden, die die Heterogenität des Untersuchungsmaterials berücksichtigen, wiederholt werden und zwar sowohl an den Gesamtkomponenten A und B als auch an den daraus isolierten Unterfraktionen (A_1 , A_2 , A_3 und B_1 , B_2 , B_3). Dazu wurden folgende Verfahren angewandt:

1. Gleichgewichtsläufe in der Multichannelzelle nach der Yphantis-Methode (56), die ein echtes Gewichtsmittel der Molekulargewichte liefert.
2. Die Methode der Lichtstreuung, die das gleiche Mittel gibt.

Die mit der Yphantis-Methode (56) erhaltenen Molekulargewichte und die Sedimentationskoeffizienten, die alle bei einer Eiweißkonzentration von 0,27 g/100 ml bestimmt wurden, sind in Tabelle 6 aufgeführt.

T a b e l l e 6

Nach der Yphantis-Methode erhaltene Molekulargewichte.

Komponente	Prozentualer Anteil	$S_{20,w}^{0,27}$	M_w	Berechnete Mittel des M_w für A bzw. B
A ₁	60	2,2	85.000	
A ₂	33	2,2	80.000	78.000
A ₃	7	1,8	46.000	
B ₁	53,4	3,2	140.000	
B ₂	23,6	3,0	125.000	120.000
B ₃	23	2,7	68.000	

Die mit Hilfe der Lichtstreuungsmethode bei einer Konzentration von 0,7 g/100 ml gemessenen apparenten Gewichtsmittel des Molekulargewichtes M_w für Komponente A und B betragen 60.000 bzw. 100.000. Wenn man bedenkt, daß die wahren, auf $c=0$ extrapolierten M_w -Werte wahrscheinlich um 10 bis 20 % höher liegen, ist die Übereinstimmung mit den aus den Molekulargewichten der Unterfraktionen berechneten Mitteln (siehe letzte Spalte in Tab. 6) zufriedenstellend. Daß die früher für Komponenten A und B nach der Abschätzungsmethode von Williams et al (55) gewonnenen Molekulargewichte zu niedrig gefunden wurden, ist nach Kenntnis der breiten Molekulargewichtsverteilung (siehe oben) erklärbar. Aus den für die Mischungen erhaltenen, breiten Gipfeln lassen sich keine definierten Sedimentationskonstanten bestimmen und die Auftragung nach Williams et al (55) gilt überdies nur für molekulareinheitliche Substanzen.

Eine weitere Bestätigung für die Richtigkeit der mit der Yphantis-Methode erhaltenen Molekulargewichte liefert ein Diagramm, in das die Sedimentationskoeffizienten der

Einzelkomponenten gegen die Quadratwurzel ihrer Molekulargewichte aufgetragen sind. Eine solche graphische Darstellung sollte eine Gerade ergeben. Dies ist wirklich mit großer Genauigkeit der Fall; auch die Wertepaare für die α_1 bzw. α_2 -Komponenten, entnommen aus früheren Versuchen von Engel (57), liegen auf der gleichen Geraden. Nur der Wert für B_3 weicht stark ab, was wahrscheinlich mit einem Fehler in der Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten erklärbar ist (siehe Abb. 22).

Zusammenfassend kann aus den neuen Ergebnissen der Molekulargewichtsbestimmungen folgendes geschlossen werden: Die bei der Charakterisierung der Unterfraktionen einzige als einheitlich erkannte Fraktion A_1 mit einem gefundenen Molekulargewicht von 85.000 ist durch Abspaltung kleinerer Bruchstücke aus einer α_1 -Kette entstanden. Daß diese Abspaltung nicht spezifisch ist oder zu einem definierten Endprodukt führt, wurde schon vorher diskutiert. Die in A_2 enthaltenen Komponenten mit einem mittleren Molekulargewicht von 80.000 dürften ebenfalls solche unterschiedliche weitere Abbauprodukte darstellen. Das gleiche trifft für A_3 zu, dessen prozentualer Anteil jedoch sehr gering ist.

Überraschend waren die Werte der Molekulargewichtsbestimmungen für die Fraktionen B_1 und B_2 , die unter Berücksichtigung methodisch bedingter Fehler in der Größenordnung liegen, wie diejenigen der Kollagen-Einzelketten. Eine Erklärung ist hier möglich durch die Annahme von Aggregat-Bildung. Eine Bestätigung dieser Annahme liefert ein Versuch (58), bei welchem Lösungen der Komponente B bei pH 3,7; 18° C in der Lichtstreuungsmethode bei Untersuchungen über längere Zeiten (4 Tage) laufend höhere Molekulargewichte festgestellt wurden und diese schließlich einen Wert von 500.000 erreichten. Gleiche Versuche mit der Komponente A ergaben ein ähnliches Verhalten, allerdings tritt hier die Aggregat-Bildung langsamer ein. Nach 10 Tagen wurde ein Wert von 260.000 erreicht.

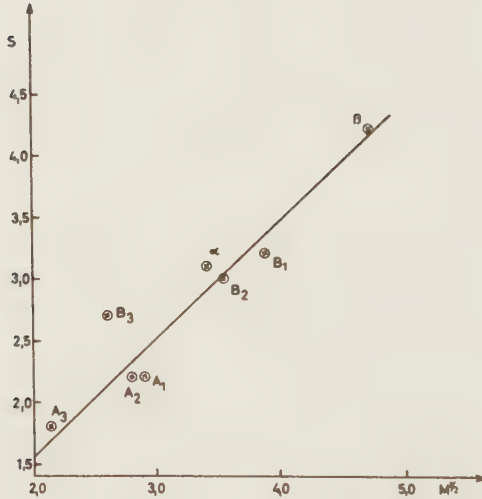


Abb. 22 Aufgetragen: Sedimentationskoeffizienten gegen Quadratwurzel der Molekulargewichte.

5) Versuche zur Renaturierung

Nach den Ergebnissen aus unserem Institut (20,21,22,23), die inzwischen auch in anderen Arbeitskreisen (59,60) reproduziert werden konnten, lassen sich hitzedenaturierte Kollagenlösungen, in denen geknäuelte, völlig desorientierte Einzelketten vorliegen, unter besonderen Versuchsbedingungen in Vitro ohne zusätzliche katalysierende Einflüsse in hoher Ausbeute zu normalen Stäbchenmolekülen renaturieren. Die Beobachtung des Verlaufes der Renaturierung erfolgt dabei unter anderem am zweckmäßigsten durch Verfolgung der optischen Drehung. Es kann gezeigt werden, daß

der Drehwert von denaturiertem Material ($[\alpha]_{405} = -360$) bei der Renaturierung wieder annähernd den Drehwert des nativen Materials ($[\alpha]_{405} = -1040$) erreicht. Wie in der Einleitung erwähnt, können aus renaturierten Tropo-kollagenlösungen Long-Spacing-Segmente (SLS) erhalten werden und unter besonderen Versuchsbedingungen lassen sich auch aus gespaltenen Ketten verkürzte Teilsegmente gewinnen.

Ich habe das Renaturierungsverhalten der Komponenten A und B durch Messung der spezifischen optischen Drehung verfolgt und versucht, mit ATP verkürzte Teilsegmente zu erhalten. Die optische Drehung wurde bei 405 mμ gemessen (Abb. 23). Die Lösungen wurden zuerst bei 40° C 30 Minuten denaturiert und sofort auf 18° C bzw. 4° C abgekühlt. Zur Messung wurden thermostatisierte Küvetten verwendet. Die optische Drehung wurde über einen Zeitraum von 100 Stunden verfolgt.

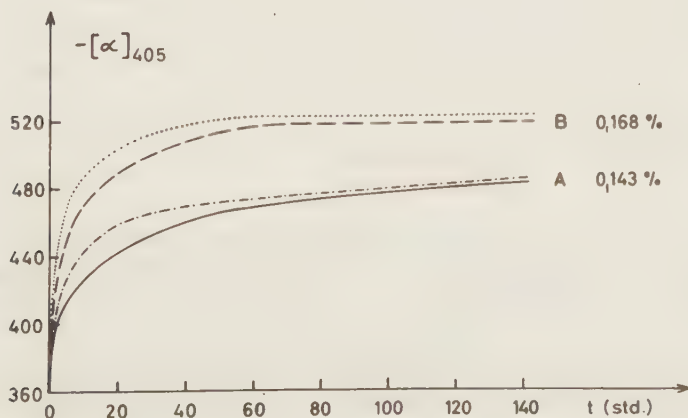


Abb. 23 Renaturierung von Komponenten A und B. Ver-
folgung der spezifischen optischen Drehung.

—	Komponente A (18°)	----	Komponente B (18°)
-.-.-	Komponente A (4°)		Komponente B (4°)

Wie aus dem Kurvenverlauf zu entnehmen ist, findet eine gewisse Renaturierung statt. Der Wert der optischen Drehung für native Tropokollagen ($[\alpha]_{405} = -1040$) Lösungen, wird bei Komponente A sowohl bei 18° C als auch bei 4° C jedoch nur zu 46 % und bei Komponente B zu 50 % erreicht. Es ist daher anzunehmen, daß bei der alkalischen Spaltung eine weitgehende Veränderung der Kollageneinzelketten erfolgt ist und eine völlige Reorganisation der Bruchstücke zum normalen Tropokollagen-Molekül nicht mehr möglich ist (50). Trotz dieser Ergebnisse habe ich versucht, zumindest aus der A₁-Fraktion, die nach meinen Befunden einheitlich war und eine verkürzte α -Kette darstellt, durch ATP-Fällung Segmente zu gewinnen. Dazu wurden 2 ml einer 0,10 %igen Lösung der Fraktion A₁ im Kühlraum bei +4° C gegen eine 0,4 % ATP-Lösung vom pH 3,5 3 Tage dialysiert. Elektronenmikroskopische Betrachtung des im Dialysierschlauch entstandenen Präzipitates ließ jedoch keine differenzierte Feinstruktur erkennen. Es muss daher angenommen werden, daß die alkalische Behandlung, selbst unter den eingehaltenen milden Bedingungen des pH-Wertes, der Zeit und der Temperatur eine so tiefgreifende Veränderung der Einzelketten und ihrer Ladungsmuster verursacht, daß eine Orientierung zu Segmenten (Teil-SLS) nicht mehr möglich ist.

C. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Im Hinblick auf die Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit kann man aus meinen Versuchen und ihren Ergebnissen folgendes feststellen:

Die alkalische Spaltung von denaturiertem Tropokollagen bei pH 12 und bei 40° während 30 Minuten führt nicht, wie zunächst angenommen wurde, zu einem fast vollständigen und einheitlichen Übergang der α - und β -Ketten in Bruchstücke von etwa der Hälfte der Kettenlänge einer α -Kette.

Schon das Ergebnis, daß bei einer weiteren alkalischen Behandlung zumindest der Komponente B über längere Versuchszeiten oder bei höheren Temperaturen eine weitere Aufspaltung dieser Komponente erfolgt, zeigte, daß der Abbau zu keinem scharfen Endpunkt führt. Die Menge der Komponente B nimmt dabei im gleichen Verhältnis ab, wie dafür im Chromatogramm der CM-Cellulosetrennung ein neuer Peak mit der Elutionsgeschwindigkeit der Komponente A erscheint. Dieser Befund bestätigt in etwa auch das Ergebnis meiner Diplomarbeit, wonach bei der alkalischen Behandlung von denaturiertem Tropokollagen unter den angegebenen Bedingungen nach 20 Minuten neben den neu aufgetretenen Komponenten A und B keine α - und β -Ketten mehr festzustellen waren, daß aber bei Abbauversuchen über die 5-fache Zeit hinaus eine merkliche Abnahme der B-Komponente zugunsten einer Vermehrung der Komponente A deutlich wurde.

Die erst in dieser Arbeit aufgenommene Kinetikkurve der alkalischen Spaltung (Abb. 9) läßt erkennen, daß wir es mit einem recht komplexen Vorgang zutun haben. Wie bereits oben ausgeführt, wird in einer schnellen Reaktion innerhalb von 15 Minuten die Hauptmenge der Bindungen gespalten. Danach wird eine geringe Abnahme der frei gewordenen Aminogruppen beobachtet, was durch einen Ringschluss erklärt werden kann. In einer weiteren langsam verlaufenden Reaktion läuft eine unspezifische Spaltung stetig weiter.

Daß es sich bei den spaltbaren Bindungen um Peptidbindungen handeln muss, konnte ich schon in meiner Diplomarbeit nachweisen, da auch am alkalisch behandelten Material die Zahl der hydroxylaminempfindlichen Bindungen (Esterbindungen) gegenüber den nicht behandelten annähernd gleich geblieben war.

Aus dem Verlauf der Kinetikkurve kann angenommen werden, daß bei Abbauzeiten zwischen 20 Minuten und etwa 1 Stunde eine gut zu fassende Zwischenphase erreicht wird, in der

sich keine merkliche Veränderung der Abbauprodukte ergibt. In dieser Zeit sind etwa 13 Bindungen pro α -Kette geöffnet worden. Der Hauptteil der spaltbaren Bindungen führte zu Bruchstücken von niederem Molekulargewicht (in der Hauptsache Aminosäuren) und nur 2-3 Bindungen wurden gespalten, die größere Bruchstücke ergaben. Die niedermolekularen, leicht dialysierbaren Anteile sind es auch, die von Sekundärreaktionen betroffen sind, welche sich durch eine Verminderung der freien Aminogruppen äußern. (Vergl. Abb. 9, Kurve A und B). Da das Ziel dieser Arbeit die Isolierung und nähere Charakterisierung der großen Spaltstücke war, habe ich auf eine Klärung der Mechanismen dieser Sekundärreaktionen bewußt verzichtet. Daß dabei Ringschlussbildungen zu Diketopiperazinen (die nach ihrer Abspaltung und weiteren alkalischen Behandlung wieder zu freien Aminosäuren hydrolysiert werden) mit eine Rolle spielen dürften, ist sehr wahrscheinlich. Eine gewisse Bestätigung dieser Auffassung ergibt sich aus dem Ergebnis der Endgruppenbestimmungen im Zusammenhang mit der Aminosäurezusammensetzung des dialysierbaren Anteils, wie schon früher diskutiert wurde (siehe Seite 28).

Aus den bisher vorliegenden Befunden konnte noch angenommen werden, daß die aus der Zwischenphase des Abbaus isolierten Komponenten A und B nach Wegdialysieren der niedermolekularen Anteile nur wenige verhältnismäßig große einheitliche Spaltprodukte enthielten. Dafür sprach auch das Auftreten von zwei sehr schmalen, scharf getrennten Peaks bei der Chromatographie an CM-Cellulosesäulen.

Auch die in meiner Diplomarbeit beschriebenen Versuche zur Auftrennung der Komponenten A bzw. B in der Hochspannungspapierelektrophorese bestärkten diese Auffassung. Es konnten damals, obwohl die Trennungen nicht sehr scharf waren, jeweils 2-3 Unterfraktionen festgestellt werden.

Die in dieser Arbeit erstmals versuchte Auftrennung der

Komponenten A und B in der Stärkegelelektrophorese zeigte in dieser Arbeitsweise bei beiden Komponenten ebenfalls deutlich zwei Hauptfraktionen neben einer schwächeren.

Erst die Ergebnisse der sogenannten Disc-Elektrophorese in Acrylamidgel machten es deutlich, daß es sich bei den Komponenten A und B doch um heterogene Gemische einer ganzen Anzahl von Bruchstücken handelt.

Die Wanderungsgeschwindigkeit einer der beiden bei Komponente A deutlich hervortretenden Hauptfraktionen entspricht der der intakten α_1 -Kette, eine etwas schwächere Fraktion zeigt die gleiche Beweglichkeit wie die α_2 -Kette.

Dieser Befund kann so gedeutet werden, daß durch den alkalischen Abbau die α -Ketten keine sehr weitgehende Kettenverkürzung erfahren haben konnten. Sie hätten sich sonst bei der Gel-Elektrophorese - bei der bekanntlich durch den sogenannten "Siebeffekt" ein zur elektrophoretischen Beweglichkeit zusätzlicher Trenneffekt erreicht wird - von den intakten Kollageneinzelketten in ihrer Beweglichkeit stärker unterscheiden müssen.

Dieser Befund steht in gewissem Widerspruch zu dem früher für Komponente A aus Sedimentationsdaten ermittelten Molekulargewicht von 50.000. Vermutlich waren jedoch diese Bestimmungen - bedingt durch die Heterogenität der Spaltstücke - nicht zuverlässig.

Die Ergebnisse der neuen, in dieser Arbeit beschriebenen, der Heterogenität des Untersuchungsmaterials Rechnung tragenden Molekulargewichtsbestimmungen (Yphantis-Methode, Lichtstreuung) stehen in guter Übereinstimmung mit den oben diskutierten Ergebnissen der Disc-Elektrophorese. Es wurde für Komponente A ein mittleres Molgewicht von 78.000 ermittelt.

Das Disc-Elektropherogramm der Komponente B zeigt 3 relativ starke und eine Anzahl schwächere Fraktionen. Die Beweglichkeit von 2 der starken Fraktionen entspricht der der α -Ketten. Die neuen Molgewichtsbestimmungen an B ergaben ein Mittel von 120.000 (früher aus Sedimentationsdaten zu 60.000 errechnet). Zusammen mit den Befunden in der Disc-Elektrophorese werden auch die Ergebnisse der Endgruppenbestimmungen sowohl am Aminoende als auch am Carboxylende, die zum Teil halbquantitativ ausgearbeitet wurden, verständlich. Sowohl bei Komponente A als auch bei Komponente B wurde in Bestätigung

früherer eigener Befunde in der Hauptmenge Glycin aminoendständig gefunden. Eine quantitative Abschätzung ergibt, daß einem endständigen Glycin eine Peptidkette mit einem Molekulargewicht von 40.000 (bei A) oder von etwa 65.000 (bei B) entspricht. Dieses Ergebnis steht durchaus nicht im Widerspruch zu dem mit physikalischen Methoden ermittelten Molekulargewicht. Schon kleinere Beimengungen eines niedermolekularen Peptids mit Glycin als Endgruppe drücken das Zahlenmittel des Molekulargewichtes der Hauptkomponente bei dieser Methode stark herunter.

Die in geringen Mengen auftretenden anderen Aminoendgruppen wie Asparaginsäure, Glutaminsäure, Alanin, Serin und Prolin sind zusammen mit dem disc-elektrophoretischen Befund so zu deuten, daß der Abbau nicht selektiv nur an einer oder zwei besonders alkaliempfindlichen Stellen und zwar hundertprozentig erfolgt (schneller Spaltungsschritt während der ersten 20 Minuten), sondern, daß unvollständig und fortschreitend auch andere Bindungen aufgehen, die eine Vielzahl von Bruchstücken unterschiedlicher Kettenlänge ergeben.

Als carboxyl-endständige Aminosäuren wurde neben Spuren von Prolin, Alanin und Phenylalanin als Hauptmenge Glutaminsäure und Glycin etwa zu gleichen Teilen gefunden. Quantitative Aussagen können hier wegen der schlechten Ausbeuten bei der Carboxylendgruppenbestimmung nach Akabori nicht gemacht werden. Grobe Schätzungen bestätigen aber die quantitativen Aussagen aus der Amino-Endgruppenbestimmung. Die weitere Aufgabe, wenigstens die entstandenen Hauptkomponenten in präparativem Maßstab rein zu isolieren, war nach den vorliegenden Ergebnissen über die Heterogenität der beiden Komponenten A und B eine schwer zu lösende Aufgabe.

Nach negativ verlaufenden Versuchen in der trägerfreien kontinuierlichen Elektrophorese und bei Chromatographie an CM- und Phosphat-Cellulose sowie an Bio-Gel (Acrylamid) gelang schließlich die Trennung an Sephadex G-200. Es konnten sowohl bei Komponente A als auch bei Komponente B chromatographische Verteilungskurven erhalten werden, die durch scharfes Schneiden eine Unterteilung in drei Fraktionen mit der Bezeichnung A_1 , A_2 , A_3 bzw. B_1 , B_2 , B_3 erwarten ließ. Aber auch nach Rechromatographie war es nur im Falle der Fraktion A_1 möglich, diese nahezu einheitlich zu erhalten, während alle übrigen sowohl nach dem Ergebnis der Disc-Elektrophorese als auch dem der Endgruppenbestimmungen als weitgehend uneinheitlich bezeichnet werden mußten.

Die nähere Charakterisierung der als einheitlich gefundenen Komponente A_1 ergab, daß sie ein Molekulargewicht von etwa 85.000 aufweist (Tabelle 6) und Glycin als aminoendständige Aminosäure besitzt. Für die beiden weiteren Unterfraktionen (A_2 , A_3) wurde ein mittleres Molekulargewicht von 80.000 bzw. 46.000 ermittelt.

Aus Komponente B konnten zum überwiegenden Teil Bruchstücke (B_1 , B_2) isoliert werden, die nach den neuen Ergebnissen der Molekulargewichtsbestimmungen unter Berücksichtigung methodisch bedingter Fehler etwa der Länge einer α -Kette entsprechen (Tabelle 6). Daneben fanden sich auch solche mit einem mittleren Molekulargewicht von 68.000 (B_3).

Daß die früher (33) für Komponenten A und B aus den Sedimentationskonstanten ermittelten Molekulargewichte (50.000 bzw. 60.000) zu niedrig gefunden wurden, ist aufgrund der breiten Molekulargewichtsverteilung, die sich aus der Heterogenität des Untersuchungsmaterials ergibt, zu erklären. Gleichgewichtsläufe in der Multichannelzelle nach der Yphantis-Methode, die in dieser Arbeit durchge-

führt wurden, ergaben dagegen ein echtes Gewichtsmittel der Molekulargewichte. Die mit der Methode der Lichtstreuung ermittelten Molekulargewichte zeigten eine befriedigende Übereinstimmung zu den obigen Befunden und bestätigten deren Richtigkeit.

Aus dem Ergebnis der Molekulargewichtsbestimmungen kann folgendes geschlossen werden:

Die einzige, weitgehend einheitlich isolierte Fraktion A_1 mit einem Molekulargewicht von 85.000 dürfte durch Abspaltung eines kürzeren Bruchstückes aus einer α_1 -Kette entstanden sein. Da die Spaltung zu keinem sehr scharfen Endpunkt führt, werden darüber hinaus Abbauprodukte mit unterschiedlicher Kettenlänge und einem mittleren Molekulargewicht von 80.000 gefunden (A_2). Größenordnungsmäßig könnten die in A_3 enthaltenen Fraktionen die kleineren Spaltstücke einer α_1 -Kette darstellen.

Die aus Komponente B erhaltenen Fraktionen (B_1 , B_2) weisen überwiegend Molekulargewichte von der Größenordnung einer α_2 -Kette auf. Hierbei dürfte es sich aber sehr wahrscheinlich um Aggregate handeln. Dafür spricht auch der Befund, daß bei Untersuchungen in der Lichtstreuungsmethode über längere Zeit das Molekulargewicht der Komponente B laufend ansteigt und schließlich Werte von etwa 500.000 erreicht werden. Bei Komponente A ist dagegen die Tendenz zur Aggregatbildung bedeutend geringer. Eine Erklärung für dieses Verhalten liegt vielleicht in der etwas unterschiedlichen Aminosäurezusammensetzung der Komponente A (entsprechend der α_1 -Kette) und Komponente B (entsprechend der α_2 -Kette). Es fällt auf, daß Komponente B gegenüber A einen höheren Gehalt an den Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin aufweist. Vielleicht spielen hydrophobe Bindungen bei der Aggregatbildung eine Rolle, die wegen des höheren Gehaltes der genannten Aminosäuren bei Komponente B stärker in Erscheinung treten als bei A.

Auch der deutliche Unterschied im chromatographischen Verhalten an CM-Cellulose spricht für diese Annahme. Auch

hier könnten hydrophobe Bindungskräfte an der Cellulosefaser die Ursache für die geringere Elutionsgeschwindigkeit der B-Komponente gegenüber der Komponente A sein. Ladungsunterschiede sind hier wegen der fast gleichen Zusammensetzung im Gehalt an polaren Aminosäuren nicht so gravierend, um einen deutlichen Trenneffekt bei der Ionenaustauscherchromatographie (CM-Cellulose) erwarten zu lassen.

Aus ähnlichen Gründen könnte der höhere Anstieg der spezifischen optischen Drehung bei der Renaturierung von Komponente B gegenüber A (Abb. 23) mit dem höheren Gehalt der genannten Aminosäuren zusammenhängen, da zusätzliche hydrophobe Bindungen die Starrheit der Helix erhöhen können. Es gelang unter den mitgeteilten Versuchsbedingungen der Renaturierung bei Komponente A den Drehwert nativer Kollagenlösungen zu 46 % bei Komponente B aber bis zu über 50 % zu erreichen.

Dagegen ist es nicht möglich gewesen, mit Komponente A₁ - als einzige einheitliche Fraktion - durch ATP-Behandlung LSL-Teilsegmente mit elektronenmikroskopischer Querstreifung zu erhalten. Es muss daher angenommen werden, daß die alkalische Behandlung die Einzelketten und deren Ladungsmuster so tiefgreifend verändert, daß eine Orientierung zu Segmenten bzw. Teilsegmenten nicht mehr möglich ist.

So interessant die Feststellung der Existenz einiger weniger hoch alkali-labiler Peptidbindungen im Kollagen ist, so dürfte doch die Alkalispaltung für die Gewinnung hochmolekularer definierter Spaltstücke nur von untergeordneter Bedeutung sein, da sie nicht scharf genug von Sekundärreaktionen und unspezifischen Spaltungen abgegrenzt werden kann.

D. EXPERIMENTELLER TEIL

1) Herstellung von neutralsalzlöslichem Kollagen.

Als Ausgangsmaterial dienten Häute von wenige Tage alten Kälbern. Zunächst wird die Haarschicht der Häute mechanisch restlos entfernt. Das so erhaltene Corium wird in Stücke von 2 x 2 cm geschnitten und in der Tiefkühltruhe (-25°C) eingefroren. Anschließend wird der steife Kuchen mit dem Meißel zerkleinert und durch einen Fleischwolf gedreht. Um eine ausreichende Kühlung zu gewährleisten, werden hin und wieder Eiswürfel mit durch den Wolf gedreht. Der so aus einer Haut erhaltene Brei wurde 4 mal mit je 6 l 0,45 m Natriumchloridlösung (131,51 g in 5 l Wasser) jeweils über Nacht bei 4°C extrahiert und anschließend zentrifugiert. Den vereinigten Neutralsalzlösungen wurde 20 % Natriumchlorid zugesetzt. Der dadurch ausgesalzene gelartige Niederschlag wurde abzentrifugiert und in 0,25 m Citratpuffer von pH 3,7 (22,06 g Natriumcitrat. $2\text{H}_2\text{O}$ + 31,53 g Citronensäure. H_2O) gelöst. Diese Citratpufferlösung wurde ca. 3 Tage gegen Wasser (eingestellt auf pH 7) dialysiert. Um sehr reine Präparate zu gewinnen, wiederholt man diesen Vorgang 2-3 mal. Alle Arbeitsgänge wurden bei einer Temperatur von $+4^{\circ}\text{C}$ ausgeführt. Das in den Dialyseschläuchen ausgefallene Kollagen wird schließlich von neuem abzentrifugiert und das Sediment in Citratpuffer (pH 3,7) gelöst, so daß eine etwa 0,5 %ige Lösung erhalten wird. Die in Portionen abgefüllten Kollagenlösungen werden in der Tiefkühltruhe aufbewahrt und sind so längere Zeit haltbar. Aus etwa 3.000 g Corium konnte auf diese Weise 2,8 g neutralsalzlösliches Kollagen (Trockengewicht) gewonnen werden. Der Stickstoffgehalt wurde nach Kjeldahl bestimmt und ergab einen Wert von 17,5 %.

2) Darstellung von citratlöslichem Kollagen.

Die Gewinnung von citratlöslichem Tropokollagen erfolgte nach einer etwas abgewandelten Vorschrift von Orechowitsch und Mitarbeitern (35).

Der nach der NaCl-Extraktion abzentrifugierte Hautbri-
rückstand wird anschließend mit Natriumbicarbonatlösung
in der Überlaufzentrifuge unter Kühlung mit Kohlensäure-
schnee gewaschen, portionsweise mit jeweils dem 5-fachen
Volumen eines 0,25 m Citratpuffers vom pH 3,7 versetzt
und unter Zusatz von einigen Tropfen Toluol über Nacht
bei ca. +4° C geschüttelt. Die durch Zentrifugation ge-
wonnene klare Kollagenlösung wird in dünnen (Ø 18 mm)
Dialysierschläuchen gegen häufig gewechseltes Wasser
(eingestellt auf pH 7) bei +4° C dialysiert. Die Extraktions-
prozedur wird noch 3 mal wiederholt. Insgesamt wird also
der nach NaCl-Extraktion verbliebene und gewaschene Rück-
stand 4 mal mit Citratpuffer extrahiert. Weitere Ex-
traktionen zeigten keine wesentliche Verbesserung der Aus-
beute. Die Citratpufferextrakte 2, 3 und 4 wurden ebenso
wie Extrakt 1 gegen Wasser (eingestellt auf pH 7) dialysiert.
Nach einer Dialysezeit von 2-3 Tagen fallen Kollagen-
fibrillen in den Dialysierschläuchen aus. Der flockige
weiße Niederschlag wird abzentrifugiert und wie oben unter
1) beschrieben, weiter behandelt und aufbewahrt. Aus etwa
3.000 g Corium kann man nach diesem Verfahren 70-80 g
citratlösliches Kollagen (Trockengewicht) erhalten. Die
Bestimmung des Gesamtstickstoffes nach Kjeldahl ergab
für das so hergestellte Kollagen einen Wert von 17,13 %, der
Aschegehalt betrug 0,25 %. Das Präparat enthält 0,6 %
Hexosen.

3) Chromatographische Trennung von hitzedenaturiertem Kollagen an CM-Cellulose.

a) Elutionslösungen

0,07 m Natriumacetatpuffer pH 4,8 (Ausgangspuffer).

Puffer für Konzentrationsgradienten:

0,07 m Natriumacetatpuffer enthaltend zusätzlich 0,1 m
NaCl.

b) Präparation der CM-Cellulose-Säulen

CM-Cellulose wurde in reichlich Wasser aufgeschlämmt. Nach

mehrmaligem Dekantieren der feinen Teilchen wurde der Ionenaustauscher mit dem Ausgangspuffer (0,07 m Natriumacetatpuffer pH 4,8) equilibriert. Anschließend wurde der Ionenaustauscher in eine Säule von 2,5 Durchmesser und 25 cm Länge gleichmäßig mit 0,7 atü eingeschlämmt. Die Säule wurde über Nacht mit 0,07 m Natriumacetatpuffer pH 4,8 gespült und ist zur Benutzung bereit.

c) Denaturierung des Tropokollagens.

6 ml der 0,5 % Lösung des neutralsalzlöslichen bzw. citratlöslichen Tropokollagens in 0,25 m Citratpuffer pH 3,7 wurden gegen 0,1 n Essigsäure dialysiert, um die Citrationen zu entfernen, welche die Trennung an CM-Cellulose stören würden. Die dialysierte Lösung wurde bei 40° C 30 Minuten denaturiert und sofort auf die wie oben beschrieben, präparierte Säule aufgetragen.

d) Elution der Säule.

Die Säule wird mit einem linearen Ionenstärkegradienten, der mit Hilfe der in Abb. 24 dargestellten Anordnung hergestellt wird, eluiert. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug 80 ml/h.

Zu Beginn der Trennung befinden sich im Mischgefäß 450 ml 0,07 m Natriumacetatpuffer, im Gradientengefäß 450 ml des 0,07 m Natriumacetatpuffers, der 0,1 m NaCl enthält. Während der Säulenelution steigt die Natriumionenkonzentration von 0,07 m (Start) auf annähernd 0,17 m (Ende). Die Trennung dauert etwa 8 Stunden.

e) Registrierung der Ergebnisse.

Die kontinuierliche Registrierung der optischen Dichte des Säuleneluates erfolgte mittels Beckman Spektralphotometer DB bei der Wellenlänge von 230 m μ (vergl. Abb. 5). Das Eluat wurde nach dem Verlassen der Durchflußküvette in Portionen von 6 ml mittels eines Fraktionssemmers aufgefangen.

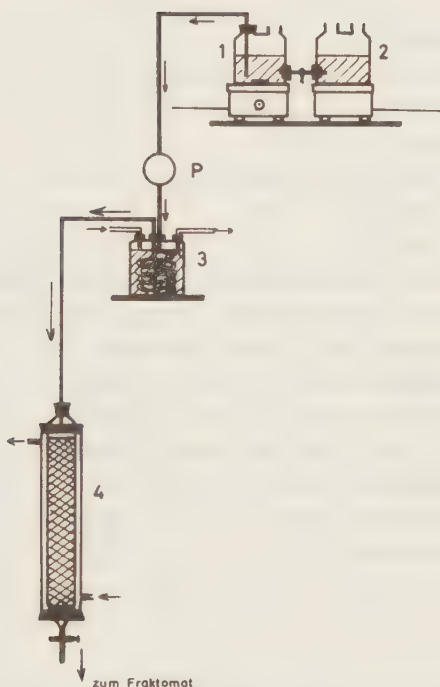


Abb. 24 Schematische Darstellung der Anordnung zur Herstellung des Ionenstärke-Gradienten.
 S = CM-Cellulose-Säule; 1 = Mischgefäß;
 2 = Vorratsgefäß; 3 = Vorratsgefäß für Gradientenpuffer; p = Pumpe

4) Präparative Darstellung der Komponenten A und B.

a) Alkalibehandlung des Tropokollagens.

50 ml der 0,5 %igen Tropokollagenlösung (entsprechend 250 mg Kollagen) wurde gegen 0,1 n Essigsäure dialysiert und 30 Minuten bei 40° C denaturiert. Durch vorsichtige Zugabe von 1 n Natronlauge wurde der pH-Wert auf 12 gebracht und die Mischung 20 Minuten bei 40° C gehalten. Die so behandelte Lösung wird sofort abgekühlt und gegen 0,1 n Essigsäure dialysiert. Der Anteil der dialysierbaren Bruchstücke betrug 3 % der eingesetzten Menge.

b) Trennung an der CM-Cellulose-Säule.

Pufferlösungen:

Stammlösung: 0,5 m Na-Acetatpuffer pH 4,8 (68 g Na-Acetat + 19 ml Eisessig pro 1 l Wasser)

Elutionslösungen:

0,07 m : 140 ml 0,5 m Stammlösung $\longrightarrow$ 1 l Wasser

0,17 m : 350 ml 0,5 m Lösung $\longrightarrow$ 1 l Wasser

Die Präparation der CM-Cellulose-Säulen von 40 cm Länge und 3,5 $\varnothing$ erfolgte wie oben ausführlich beschrieben. Die alkalibehandelten Abbauprodukte wurden auf eine CM-Cellulose-Säule aufgetragen. Nachdem 750 ml des 0,07 Natriumacetatpuffers durchgelaufen waren, wurde die Elution mit 0,07 m Natriumacetatpuffer fortgesetzt. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 120 ml/h. Die Proteinkonzentration in den einzelnen aufgefangenen Fraktionen wurde nach Lowry bestimmt.

5) Gelfiltration

a) Versuche mit Bio-Gel P-60 und P-100.

Die Gele läßt man in reichlich Wasser über Nacht quellen. Nach Dekantieren des Wassers wird das Gel mit häufig zu erneuernder 0,1 n Essigsäure equilibriert. Das Gel wurde danach in die Säulen (1 cm $\varnothing$; 40-100 cm Länge) gleichmäßig unter normalem Druck eingeschlämmt. Nach 24-stündigem Spülen mit 0,1 n Essigsäure waren die Säulen fertig zum Gebrauch. Je 20 mg der Komponente A bzw. Komponente B wurden in 2 ml 0,1 n Essigsäure gelöst und auf verschiedene Säulen derselben Dimension aufgetragen. Die Säulen wurden mit 0,1 n Essigsäure mit einer Geschwindigkeit von 6 ml in der Stunde eluiert. Die Fraktionen wurden mittels eines Fraktionssammlers in Portionen von 2 ml aufgefangen. Die Proteinkonzentration in den Fraktionen wurde durch Extinktionsmessung bei 230 $m\mu$ ermittelt.

b) Gelfiltration an Sephadex G-100 und G-200.

Für die Gelfiltrationsversuche wurden die Dextran-Gele

Sephadex G-100 und G-200 (Pharmacia) benutzt. Das verwendete Sephadex-Chromatographierohr ist ein Quickfit-Präzisionsrohr mit einem Innendurchmesser von 2,54 cm und einer Länge von 40-150 cm. Diese Säulen können vollständig und nahezu ohne totes Volumen mit Gel gefüllt werden, wodurch ein Wiedervermischen schon getrennter Fraktionen vermieden wird.

Die äußerst quellfähigen Gele ($g \text{ Gel} : g \text{ Wasser} = 1 : 30$) läßt man 2-3 Tage in Wasser quellen. Danach wird dekantiert und das gequollene Gel mit dem zur Trennung vorgesehenen Puffer versetzt. Nach mehrmaligem Erneuern des Puffers wird das Gel absolut luftblasenfrei mit reichlich Puffer unter normalem Druck in die Säulen eingeschlämmt. Nachdem das Rohr völlig gleichmäßig bis zum Rand gefüllt ist, wird ein Nylon-Netz (400 mesh) aufgelegt und das Kopfstück befestigt. Die Säulen werden zur Equilibrierung 24 Stunden mit 0,1 n Essigsäure gespült. Die gefüllten Säulen dürfen keinen Temperaturschwankungen ausgesetzt sein, da sich sonst die Trennung störende Gasblasen bilden.

Die chromatographische Auftrennung der Komponenten A und B wurde aufsteigend durchgeführt. Dazu wurden je 30 mg Substanz in 3 ml 0,1 n Essigsäure gelöst und mittels Schlauchpumpe von unten in die Säule eingeführt. Dieselbe Pumpe wurde zum Einbringen der Elutionslösung verwendet. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug bei Sephadex G-100 10 ml/h, bei Sephadex G-200 6 ml/h. Eine raschere Elution war wegen des relativ hohen Widerstandes in den Säulen nicht möglich. Obgleich die Verwendung längerer Säulen eine Verbesserung der Auftrennung versprach, waren wir wegen des dann noch höheren Druckes gezwungen, uns auf 100 cm Säulen zu beschränken. Das Eluat wurde in Portionen von je 3 ml aufgefangen. Der Proteingehalt der Fraktionen wurde durch Extinktionsmessung bei 230 m μ ermittelt. Ein Trennversuch erforderte 3-4 Tage Laufzeit.

6) Stärkegelelektrophorese

15 g Stärke werden in 100 ml 0,02 m Natriumacetatpuffer vom pH 4,4 aufgeschlämmt. Die aufgeschlämmte Stärke wird unter Schwenken über der offenen Flamme zum Kochen gebracht und solange weiter erhitzt, bis die Lösung eine gelartige, zähflüssige Konsistenz hat. Die heiße Lösung wird in eine Form (10 x 22 cm) in einer Schichtdicke von 1/2 cm gegossen. Nach Abkühlung des erstarrten Stärkeblockes wird dieser in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Die Verbindung zu den Elektrodenpuffergefäßen erfolgt mittels Filterpapierbrücken. Als Elektrodenpuffer diente 0,05 m Natriumacetatpuffer pH 4,4. Zur Equilibrierung wurde an die Kammer eine Stunde lang eine Spannung von 800 V angelegt. Danach wird kurz der Stromkreis unterbrochen und kleine mit den zu analysierenden Proben getränkte Papierschnitzel in etwa 1 cm lange quer zu den Feldlinien verlaufende Schlitze eingeschoben. Darauf wurde der Stromkreis wieder geschlossen und die eigentliche Trennung bei 800 V (etwa 30 mA) begonnen. Nach einer Trennzeit von 5 Stunden wurde der Stärkeblock aus der Elektrophoresekammer genommen, horizontal in der Mitte durchgeschnitten und die untere Hälfte mit Amidoschwarz 10 B angefärbt.

Färbe-Methode:

2,5 g Farbstoff werden in 90 ml Methanol gelöst und 40 ml Eisessig zugefügt.

Waschbad: 90 ml Methanol + 10 ml Eisessig

Der Stärkeblock wird 10 Minuten in die Farblösung gelegt und dann durch mehrmaliges Wechseln des Waschbades entfärbt.

7) Disc-Elektrophorese

Die Disc-Elektrophorese wurde in der Apparatur von Canalco durchgeführt.

Erforderliche Lösungen:

- | | |
|--------------------------|--------------------------|
| a) 1 n KOH 48,00 ml | b) 1 n KOH 48,00 ml |
| Eisessig 17,20 ml | Eisessig 2,87 ml |
| TEMED* 4,0 ml | TEMED* 0,46 ml |
| mit Wasser auf 100 ml | mit Wasser auf 100 ml |
| pH 4,3 | pH 6,7 |
| | |
| c) Acrylamid 30,00 g | d) Acrylamid 10,00 g |
| Bis** 0,80 g | Bis** 2,50 g |
| mit Wasser auf 100 ml | mit Wasser auf 100 ml |
| | |
| e) 4,00 in 100 ml Wasser | |

Das Acrylamid wird in zwei verschiedenen Porengrößen verwendet. In dem feinporigen sogenannten Lower-Gel findet die eigentliche Trennung statt. Das grobporige Upper-Gel nimmt die Analysenlösung auf und verhindert die Ausbildung von an den Wänden nach oben gezogenen schalenförmigen Fraktionen.

Das Lower-Gel setzt sich folgendermaßen zusammen:

Lower-Gel A	Lower-Gel B
1 Teil Lösung a)	Ammoniumpersulfat 0,28 g
2 Teile Lösung c)	mit H ₂ O auf einen Liter
1 Teil Wasser	

Für das Lower-Gel wird 1 Teil Lower-Gel A und 1 Teil Lower-Gel B gemischt und in ein zunächst unten verschlossenes Glasrohr von 5 cm Länge und einem Durchmesser von 5 mm bis zu einer Höhe von 4 cm eingefüllt. Es wird vorsichtig mit Wasser überschichtet, um die Bildung eines Meniskus während der Polymerisation zu verhindern. Unter UV-Bestrahlung geht dann innerhalb von 45 Minuten die Polymerisation vor sich. Nach abgeschlossener Polymerisation wird das aufgebrauchte Wasser wieder entfernt.

Das Lower-Gel A ist beständig, während das Lower-Gel B immer frisch hergestellt werden muß.

*TEMED = N,N,N'N'-Tetramethyläthylldiamin

**Bis = N,N-Methylbisacrylamid

Das grobporige Upper-Gel wird aus folgenden Stammlösungen hergestellt:

- 1 Teil Lösung b)
- 2 Teile Lösung d)
- 1 Teil Lösung e)
- 4 Teile Wasser

Das Upper-Gel wird vorsichtig über das schon polymerisierte Lower-Gel geschichtet. Um eine Meniskusbildung zu verhindern, wird wieder mit Wasser überschichtet und dann ebenfalls 45 Minuten unter UV-Bestrahlung polymerisiert.

Auftragen der Substanz

Ca. 0,2 mg Analysensubstanz wird in 0,025 ml 0,1 n Essigsäure gelöst und 10 Minuten bei 40° C denaturiert.

Man mischt die Substanz mit 0,025 ml konzentrierter Succroslösung, die auch 10 Minuten bei 40° C gehalten war und mit 0,05 ml Upper-Gel zusammen. Diese Mischung wird auf das vorher polymerisierte Upper-Gel aufgetragen und sodann wieder mit Wasser überschichtet. Die Röhrchen bleiben 30 Minuten bei Tageslicht stehen, wobei eine leichte Polymerisation eintritt. Sodann wird das überstehende Wasser entfernt und die Röhrchen in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt.

Elektrophorese-Puffer:

Es wurde ein 0,01 m Natriumacetatpuffer vom pH 4,1 verwendet. Nach einer Laufzeit von 90 Minuten bei 100 V (7 mA) wurden die Gelstäbchen herausgeblasen. Die Anfärbung erfolgt mit Amidoschwarz 10 B (12 Stunden in Farblösung mit anschließender 24-stündiger Entfärbung).

8) Trägerfreie kontinuierliche Elektrophorese

Zur Durchführung dieser Versuche verwendete ich die von Hannig (61) entwickelte Apparatur.

a) Versuche zur weiteren Auftrennung von A bzw. B.

Puffer: a) Acetatpuffer pH 4,6 (Kammerpuffer: 0,02 m; Elektrodenpuffer: 0,08 m)

b) Phosphatpuffer pH 4,4 (Kammerpuffer: 0,02 m; Elektrodenpuffer: 0,08 m)

Etwa eine Stunde nachdem die Apparatur in Gang gesetzt war und sich somit konstante Verhältnisse (Strom, Spannung und Temperatur) eingestellt haben, wird mit der kontinuierlichen Zugabe einer etwa 0,25 % Lösung der Komponente A bzw. der Komponente B in Kammerpuffer begonnen. Die Dosiergeschwindigkeit betrug etwa 2 ml/h, die Durchlaufzeit 60 Minuten. Bei einer angelegten Spannung von 2.150 V fließt im Falle des Phosphatpuffers ein Strom von 160 mA. Pro Versuch wurden etwa 20 mg der Analysensubstanz getrennt. Die Eiweißverteilung in den Auffanggläschen wurde mittels Lowry-Test ermittelt.

b) Abtrennung von Kohlenhydraten aus Proteinfractionen nach der Sephadex-Trennung.

Puffer: 1 n Essigsäure (für Kammer und Elektroden)
Spannung 2.250 V; Strom 130 mA; Durchlaufzeit 60 Minuten.

Substanz: Die aus den Sephadex-Trennungen erhaltenen Fraktionen (B_1 , B_2 , B_3) wurden gefriergetrocknet und in Kammerpuffer gelöst. Aus den Lösungen von B_1 , B_2 und B_3 wurden unter gleichen Versuchsbedingungen die störenden Kohlenhydrate abgetrennt. Die Proteinverteilung in den Elektrophoresefraktionen wurde nach Lowry, die Zucker-
verteilung mittels Anthron-Test ermittelt.

9) Aminosäure-Bestimmung

Die quantitative Aminosäurebestimmung wurde nach der säulenchromatographischen Methode von Spakman, Stein und Moore (62,38) in der Modifikation von Hannig (63) durchgeführt.

3-4 mg der getrockneten Substanzen wurden in Hydrolyse-

kölbchen eingewogen und diese nach Zusatz von 3-4 ml destillierter 6 n HCl unter Stickstoff zugeschmolzen. Die Hydrolysedauer betrug bei 105° C 24 Stunden. Aus den Hydrolysaten wird die HCl im beheizten Vakuum-exsikkator (P₂O₅, KOH) völlig entfernt. Der Trockenrückstand wird in 0,5 ml Citratpuffer (pH 2,2) aufgenommen und je 0,2 ml auf die Säulen aufgetragen. Die Berechnung erfolgt aufgrund analog durchgeführter Eichanalysen.

10) Endgruppenbestimmungen

a) Aminoendgruppenbestimmung nach Sanger (39).

10 mg Substanz werden in 0,2 ml einer 0,2 %igen Natriumbicarbonatlösung gelöst. Dazu kommen 0,4 ml einer 5 %igen Lösung von Dinitrofluorbenzol (DNFB) in abs. Äthanol. Nachdem die Mischung 2 Stunden im Dunkeln geschüttelt wurde, wird der Alkohol im Vakuum (Wasserstrahlpumpe) abgedampft. Das überschüssige DNFB wird durch mehrmaliges Auswaschen mit Äther entfernt. Das Reaktionsprodukt wird nunmehr nach Zugabe von 2-3 ml 6 n HCl im unter Stickstoff zugeschmolzenen Hydrolysekölbchen für 8 Stunden bei 105° C hydrolysiert. Das Hydrolysat wird mehrmals mit Essigester extrahiert und die vereinigten Essigesterextrakte wiederum mehrmals mit 1 n HCl ausgewaschen. Die Essigesterphase wird nunmehr zur Trockene eingedampft und der Rückstand in einer kleinen Menge Essigester wieder aufgenommen. Diese, die DNP-Derivate der aminoendständigen Aminosäuren enthaltende Lösung wird ein- und zweidimensional dünn-schicht-chromatographisch untersucht.

Schicht: Silicagel

Fließmittel:

1) Toluol	:	Pyridin	:	Äthylenchlorhydrin	:	Ammoniak	
100		30		60		60	(1,2)
2) Benzol	:	Pyridin	:	Essigsäure			
80		20		20			

Von den Chromatogrammen wurden Photoprints angefertigt.

b) COOH-Endgruppenbestimmung nach Akabori.

Etwa 30 mg Substanz wurden in 1,0 g absolutem wasserfreiem Hydrazin, das vor dem Versuch über KOH destilliert worden war, gelöst. Die unter Stickstoff zugeschmolzenen Kölbchen wurden 10 Stunden lang bei 105° C gehalten (Trockenschrank). Dann wurden die abgekühlten Kolben geöffnet und das überschüssige Hydrazin im Hochvakuum über H₂SO₄ abgedampft. Der Rückstand wurde in 1 ml Wasser aufgenommen und mit dem gleichen Volumen Essigester, der mit p-Nitrobenzaldehyd (Braunitzer (64)) gesättigt ist, versetzt und eine Stunde geschüttelt. Anschließend wird abgenutscht und mit Wasser nachgewaschen. Das Filtrat, das die carboxylendständige freie Aminosäure enthält, wird zur Entfernung des überschüssigen p-Nitrobenzaldehyds so oft mit Essigester oder Äther geschüttelt, bis die organische Phase farblos bleibt. Die wässrige Phase wurde zur Trockene eingedampft, in 0,5 ml 2 % Natriumbicarbonatlösung aufgenommen, mit der doppelten Menge einer 5 % Lösung von Dinitrofluorbenzol (DNFB) in abs. Alkohol versetzt und 2 Stunden im Dunkeln geschüttelt. Die so erhaltenen DNP-Aminosäuren wurden mit Essigester ausgeschüttelt, die Essigesterphase nach Auswaschen mit 1 n HCl eingeeengt und chromatographiert. Die Dünnschichtchromatographie wurde nach Stahl ein- und zweidimensional auf Kieselgelplatten mit folgenden Lösungsmitteln durchgeführt:

- | | | | | | | |
|-----------|---|---------|---|--------------------|---|-------------------|
| 1) Toluol | : | Pyridin | : | Äthylenchlorhydrin | : | Ammoniak (1,25 %) |
| 100 | : | 30 | : | 30 | : | 60 |
| 2) Benzol | : | Pyridin | : | Eisessig | : | |
| 80 | : | 20 | : | 20 | : | |

11) Eiweiß-Bestimmung nach Lowry (36)

Lösung 1: 20 g Natriumcarbonat werden in etwas Wasser gelöst, dann wird 0,5 g Natriumtartrat zugefügt. Ist auch dieses gelöst, füllt man nach Zugabe von 100 ml 1 n Natronlauge mit Wasser zu einem Liter auf.

Lösung 2: 1 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ in 1 l Wasser gelöst.

Lösung 3: 45 ml Lösung 1 und 5 ml Lösung 2 (muß immer frisch hergestellt werden).

Lösung 4: 1 n Phenolreagenz nach Folin (Phenol-Reagenz nach Folin und Ciocalteu von der Firma Merck).

0,5 ml Eluat werden mit 2,5 ml Lösung 3 versetzt und 10 Minuten bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Anschließend werden 0,25 ml Lösung 4 zugegeben, 30 Minuten bei Zimmertemperatur stehen gelassen und bei 750 m μ kolorimetriert.

12) Bestimmung von Kohlenhydraten (Anthrone-Test).

Die Kohlenhydratbestimmung wurde mittels der Anthron-Zucker-Farbreaktion durchgeführt.

1 ml der Testlösung wurde unter Eiskühlung mit 5 ml frisch hergestelltem Anthronreagenz (0,2 g Anthron in 100 ml konz. H_2SO_4) versetzt. Dann wurden die Proben 10 Minuten in einem heftig siedenden Wasserbad gehalten. Anschließend wurden sie mit Eiswasser gekühlt und nach 30 Minuten die Extinktion bei 625 gemessen. Als Blindwert wurde eine zuckerfreie Probe verwendet. Auf eine quantitative Zuckerbestimmung mit Hilfe von Eichwerten wurde verzichtet.

13) Molekulargewichtsbestimmungen

Für alle Versuche wurden die Substanzen in 0,25 m Citratpuffer vom pH Wert 3,7 (26,79 g Natriumcitrat $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ werden in Wasser gelöst, der pH-Wert mit Hilfe 0,25 m Citronensäure eingestellt und auf 1 l aufgefüllt) gelöst.

Die Proteinkonzentration der bei 40° C denaturierten Analysenlösungen wurde aufgrund der optischen Drehung ermittelt. Die Messungen erfolgten bei einer Wellenlänge von 405 m μ in einem lichtelektrischen Präzisionspolarimeter der Firma Carl Zeiss, das mit einer Messgenauigkeit

von $\pm 0,0025^\circ$ arbeitet. Alle Messungen wurden bei 40° C ($\pm 1^\circ \text{ C}$) durchgeführt.

a) Gleichgewichtsläufe nach der Yphantis-Methode (56).
Bei geeigneter Wahl von Drehzahl und Konzentrationen stellt sich in der analytischen Ultrazentrifuge eine Konzentrationsverteilung ein. Aus dieser läßt sich das Molekulargewicht gelöster Proteine errechnen:

$$M = \frac{1}{r_x \cdot c_x} \cdot \left(\frac{dc}{dr} \right)_x \cdot \frac{RT}{\omega^2 (1 - \bar{v} \rho)}$$

r_x = Abstand vom Rotationszentrum; c_x = Konzentration an der Stelle x ; ω = Winkelgeschwindigkeit; $\bar{v}$ = Partialvolumen; ρ = Dichte des Lösungsmittels; R = Gaskonstante; T = absolute Temperatur.

Zur Messung wurden Zellen mit 8 Bohrungen von 1 mm Durchmesser verwendet. Jede dieser Öffnungen wurde gefüllt mit 5 μl Siliconöl FC-43 als Unterschichtungsöl und 15 μl der zu untersuchenden Lösung in jeweils verschiedener Konzentration. In die Referenzlöcher wurden jeweils 20 μl des reinen Lösungsmittels eingefüllt. Die Läufe wurden durchgeführt bei 38° C in 0,25 M Citratpuffer pH 3,7. Die Drehzahlen lagen zwischen 10.000 und 15.000. Die mit der Schlierenoptik erhaltenen Gradientenkurven wurden bei den verschiedenen Konzentrationen durch Planimetrieren ausgewertet.

b) Methode der Lichtstreuung.

Eine moderne und elegante Methode, die das Gewichtsmittel des Molekulargewichtes liefert, ist die Messung der Lichtstreuung (65).

Vom Licht eines vertikal polarisierten Primärstrahles angeregt, strahlen die Moleküle, die sich in der Lösung befinden, Streulicht in alle Richtungen aus. Dieses kann

mit einer schwenkbaren Photozelle gemessen werden. Sind die Moleküle kleiner als $\lambda/20$ (λ = Wellenlänge des Primärlichtes), so ist die Streuintensität über dem ganzen Winkelbereich gleich. Bei größeren Molekülen tritt durch Interferenz des von verschiedenen Teilen des Moleküls herrührenden Streulichtes eine von der Form und Größe des Moleküls in bestimmter Weise abhängige Schwächung des Streulichtes bei allen Winkeln (Abb. 25) außer für $\delta = 0$ auf. Durch Vergleich der gemessenen Winkelabhängigkeit des Streulichtes mit den für Molekülmodelle (Rotationsellipsoide, Stäbchen, statistische Knäuele usw. verschiedener Abmessungen) theoretisch abgeleiteten Winkelfunktionen kann man Schlüsse auf die Form der Moleküle ziehen. Für die Berechnung des Molekulargewichtes muß die Schwächung durch Interferenz eliminiert werden.

Das Molekulargewicht M wird nach der Gleichung

$$\frac{Kc}{R} = \frac{1}{M} + Ac + Bc^2$$

berechnet. Darin bedeuten R = absolute Streuintensität (cm^{-1}); c = Konzentration des Eiweiß (g/ml); K = von der Wellenlänge und einigen optischen Daten der Lösung abhängige Konstante (cm^2/g^2); A und B Konstanten, aus denen sich der 1. bzw. 2. Virialkoeffizient des osmotischen Druckes berechnen läßt.

E. ZUSAMMENFASSUNG

1. Die alkalische Behandlung denaturierter Kollagenlösungen führt nicht, wie früher angenommen, zu wenigen Untereinheiten mit etwa der halben Kettenlänge von Kollagen-einzelketten. Es werden vielmehr heterogene Gemische erhalten, wobei einige Hauptkomponenten hervortreten.

2. In der Gel-Elektrophorese können die Untereinheiten der Komponenten A und B in deutlich 7-10 Fraktionen aufgeteilt werden.

3. Endgruppenbestimmungen bestätigen durch das Auftreten mehrerer Aminosäuren am Carboxylende bzw. Aminoende die Heterogenität.

4. Die alkaliempfindlichen Stellen sind wahrscheinlich zwischen Gly-Ser bzw. Threonin bzw. Hydroxylysin und einer anderen Aminosäure zu suchen. Durch Nebenreaktionen mit anschließender Spaltung werden aber nicht die der direkten alkalischen Spaltung unterworfenen Endgruppen gefunden.

5. Die Molekulargewichte der Komponenten A und B liegen bei 85.000 bzw. 120.000.

6. Es gelang die präparative Trennung der Untereinheiten von A und B durch Chromatographie an Sephadex G-100 und G-200. Dabei wurde jedoch nur eine Fraktion mit der Bezeichnung A₁ als einheitlich gefunden. Ihr Molekulargewicht betrug 85.000.

7. Bei der Renaturierung der Komponenten A und B werden Drehwerte erhalten, die etwa 50 % nativer Kollagenlösungen entsprechen. Dagegen war es nicht möglich, mit ATP Teilstücke aus den Komponenten A bzw. B zu erhalten.

F. LITERATUR

1. F. Sanger, E.O.P. Thompson und R. Kitai:
Biochem. J. 59, 509 (1955)
2. A.B. Edmunson:
Nature 198, 354 (1963)
3. F.A. Anderer, H. Uhlig, E. Weber und G. Schramm:
Nature 186, 922 (1960)
4. G. Braunitzer, K. Hilse, V. Rudolf und N. Hilschmann:
Adv. Prot. Chem. 19, 1 (1964)
5. E. Margoliash:
Proc. Nat. Acad. Sci. 50, 672 (1963)
6. C.B. Anfinsen, S.E.G. Aqvist, J.P. Cooke und Jönsson:
J. Biol. Chem. 234, 1118 (1959)
7. B. Keil und F. Sorm:
Abst. 1st Meeting Fed. Europ. Biochem. Soc. Abst. D5
London (1964)
- 7a. B.S. Hartely:
Nature 201, 1284 (1964)
8. K.A. Walsh, D.L. Kaufmann, K.S.V. Sampth Kumar und
H. Neurath:
Proc. Nat. Acad. Sci. 51, 301 (1964)
9. P. Doty und T. Nishihara in G. Stainby's Recent Advances
in Gelatin and Glue Research,
Pergamon Press, S. 92, London (1958)
- 9a. K. Hannig und J. Engel:
Das Leder 9, 215 (1961)
10. C.E. Hall, M.A. Jakus und F.O. Schmitt:
J. Am. Chem. Soc. 64, 1234 (1942)
11. C. Wolpers:
Klin. Wochenschrift 22, 624 (1943)
" " 23, 169 (1944)
12. T.H. Nemetschek, W. Graßmann und U. Hofmann:
Z. Naturforschg. 10b, 61 (1952)
13. K. Kühn, W. Graßmann und U. Hofmann:
Naturwiss. 47, 275 (1960)
14. R.W.G. Wykoff und R.B. Corey:
Proc. Soc. Exp. Biol. 34, 285 (1936)

15. A. Rich und F.H. Crick:
Nature 176, 915 (1955)
16. G.N. Ramachandran, V. Sasisekharen und Y.T. Tathachari
in "Kollagen" (N. Ramanathen ed.) P 81 Wiley, New York
17. K.A. Piez, M.S. Lewis, G.R. Martin und J. Gross:
Biochem. Biophys. Acta 53, 596 (1961)
18. K.A. Piez:
J. Biol. Chem. 239, 12c, 4315 (1964)
19. H.G. Heidrich und L.K. Wynston:
Hoppe-Seyler's Z. 342, 1 (1965)
20. K. Kühn, J. Engel, B. Zimmermann und W. Graßmann:
Arch. Biochem. Biophys. 105, 2, 387 (1963)
21. G. Beier, J. Engel und W. Graßmann:
Vortrag: Gemeinsame Tagung Deut. Ges. Biophys., Oster. Ges.
Reine und Angew. Biophys. und Schweiz. Ges. Strahlen-
biologie, Wien (1964). Tagungsbericht S. 101
22. G. Beier:
Symp. Int. Biochem. Physiol. of Connective Tissue,
Lyon (1965)
23. G. Beier und J. Engel:
Biochem. (im Druck)
24. K. Kühn:
Das Leder 11, 110 (1960)
K. Kühn und E. Zimmer:
Z. Naturforschg. 13, 86 (1961)
25. K. Kühn:
Das Leder 13, 86 (1962)
26. K.A. Piez:
Vortrag im Max-Planck-Institut f. Eiweiß- und Leder-
forschung, München
27. H. Hörmann:
Das Leder 11, 173 (1960)
" " 13, 79 (1962)
H. Hörmann, A. Riedel, Th. Altenschöpfer und M. Klenk:
Das Leder 12, 175 (1961)
28. P.M. Gallop, S. Seifert und E. Neilmann:
Nature 183, 1659 (1959)

29. P. Bornstein und K.A. Piez:
Science 148, 1353 (1965)
30. A. Nordwig und Y.P. Dick:
Biochim. Biophys. Acta 97, 179-182 (1965)
31. M. Schleyer:
Hoppe-Seyler's Z. 329, 97 (1962)
32. W. Graßmann, K. Hannig und M. Schleyer:
Hoppe-Seyler's Z. 322, 71 (1960)
33. Nagamani M.R.:
Diplomarbeit, Universität München
34. K. Kühn und K. Zimmermann:
Arch. Biochem. Biophys. 109, 534 (1965)
K. Kühn, Ch. Tkocz, B. Zimmermann und G. Beier:
Nature (im Druck)
B. Zimmermann und K. Kühn:
(unveröffentlicht)
35. V.N. Orechowitsch und V.O. Schpikiter:
"Recent Advances in Gelatine and Glue Research"
G. Stainby ed., Pergamon Press, London, S. 87 (1958)
36. O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr und R.J. Randall:
J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)
37. L.K. Wynston:
persönliche Mitteilung
38. S. Moore und W.H. Stein:
J. Biol. Chem. 192, 633 (1951)
" " " 211, 907 (1954)
39. F. Sanger:
Biochem. J. 39, 507 (1945)
40. J.H. Bowes und J.A. Moss:
Biochem J. 55, 735 (1953)
41. H. Hörmann, Th. Joseph und M. v. Wilm:
Hoppe-Seyler's Z. 341, (1965)
42. K. Th. Joseph und S.M. Bose:
Bull. Central Leather Res. Inst. (Madras) 4, 343 (1958)
43. W. Graßmann und H. Hörmann:
Hoppe-Seyler's Z. 292, 24 (1953)
44. S. Akabori, K. Ohno und K. Narita:
Bull. Chem. Soc. Japan 25, 214 (1952)

45. W. Graßmann und H. Hörmann:
Hoppe-Seyler's Z. 292, 24 (1952)
46. B.H. Nicolet, L.A. Shinn und L.J. Saidel:
J. Biol. Chem. 142, 609 (1942)
47. G. Schramm und H. Restle:
Makromol. Chem. 13, 103 (1954)
48. O. Smithies:
Biochem. J. 61, 629 (1955)
49. L. Wynston und M.R. Nagamani:
Proc. NATO Study Inst. Connective Tissues, St. Andrews,
Scotland (1964)
50. S. Raymond:
Clin. Chem. 8, 455 (1962)
S. Raymond und M. Nakamichi:
Anal. Biochem. 7, 225, (1964)
51. P. Bornstein und K.A. Piez:
Science 148, 55 (1953)
52. J. Porath und P. Flodin:
Nature 183, 1657 (1959)
53. I. Bloemendal:
J. Chromatog. 2, 121 (1959)
" " 3, 509 (1960)
54. R.L. Wistler und M.L. Wolfram:
Methods in Carbohydrate Chemistry Vol. I, S. 389
55. J.W. Williams, W.M. Saunderson und J.S. Ciciirelli:
J. Phys. Chem. 58, 774 (1954)
56. D.A. Yphantis:
Annals of the New York Academy of Sciences 88, 586 (1960)
57. J. Engel:
Dissertation, Universität München
58. W.F. Harrington und P.H. v. Hippel:
Arch. Biochem. Biophys. 92, 100 (1961)
59. P.H. v. Hippel und W.F. Harrington:
Proc. Symp. Protein Structure Function 13, 213 (1960)
60. R.V. Rice:
Proc. Nat. Acad. Sci. 46, 1186 (1960)
61. K. Hannig:
Z. Anal. Chem. 181, 244 (1961)

62. H. Spackman, W.H. Stein und S.T. Moore:
Fed. Proc. 15, 358 (1956)
63. K. Hannig:
Clin. Chem. Acta 4, 51 (1959)
64. G. Braunitzer:
Chem. Ber. 12, 2025 (1955)
65. P. Daybe:
J. Applied Phys. 15, 338 (1944)
66. B.H. Zimm:
J. Chem. Phys. 16, 1093 (1948)

Lebenslauf

Ich wurde am 2.3.1932 als viertes Kind von M. Rangaswamy und seiner Ehefrau Padmamma in Hampapura, Mysore/Indien geboren. Von 1938 bis 1942 besuchte ich die "primary school", von 1942 bis 1946 die "middle school" und von 1946 bis 1949 die "high school", wo ich das "Metriculation Examen" ablegte. Im Jahre 1954 begann ich das Chemie-Studium an der Universität von Bombay, wo ich 1958 das "Bachelor of Science"-Examen ablegte. Im Jahre 1959 setzte ich mein Studium an der Universität München fort. Im Dezember 1961 legte ich hier das Diplom-Chemiker-Haupt-examen ab. Von Januar bis Oktober 1962 arbeitete ich am Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung in München an meiner Diplomarbeit. Im Anschluss daran habe ich bis September 1965 die vorliegende Doktorarbeit am gleichen Institut durchgeführt.

Am 10. Juni 1965 heiratete ich T.L. Nagabhushan.

